

Nanoestructuras tubulares de TiO_2 para implantes médicos

Tesis doctoral para acceder al título de Doctora en Ciencias
Biológicas de la
Universidad Nacional de Tucumán

Ing. Biomédica María Alejandra Sánchez

2012-2017

Dirección: Dra. Andrea P. Rodríguez

Laboratorio de Medios e Interfases
Departamento de Bioingeniería

Co-Dirección: Dr. David M. Comedi

Laboratorio de Física de los Sólidos
Departamento de Física

Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología
Universidad Nacional de Tucumán

Instituto Superior de Investigaciones Biológicas
CONICET



RESUMEN

La utilización de prótesis o implantes biomédicos para suplantar la función original de algún componente del sistema biológico humano es un área en continuo desarrollo. Los implantes dentales representan un tratamiento fiable para asegurar los diversos tipos de prótesis en la rehabilitación oral de pacientes edéntulos, formando parte de procedimientos estándares para el reemplazo de dientes. En la actualidad uno de los desafíos más importante que encara esta alternativa médica es permitir una osteointegración más firme y en los menores tiempos posibles. Por esa razón, en este trabajo se fabricaron modificaciones superficiales a muestras de Ti grado médico mediante un doble tratamiento, mecánico y de anodizado. En dichas muestras se evaluó la influencia de la rugosidad superficial del sustrato de Ti sobre la morfología de los NT de TiO_2 , la influencia del voltaje de anodizado en la formación de los NT de TiO_2 y a la vez se estudiaron protocolos de limpieza y tratamientos térmicos para una optimización del protocolo. Las muestras fueron caracterizadas por SEM, EDS, Raman y XRD. Se determinó la actividad antibacteriana de nuestras muestras frente a *Staphylococcus aureus*. Seguidamente, se analizó la respuesta celular *in vitro* de células osteoblásticas (hFOB 1.19) frente a nuestras muestras durante 3, 7 y 14 días de cultivo. El avance de la regeneración ósea fue caracterizado en términos de actividad de fosfatasa alcalina por determinación óptica utilizando p-nitrofenol y proliferación celular mediante tinción MTT. Además, mediante imágenes de MEB de las estructuras biológicas se pudo evaluar la interacción celular con la superficie nanoporosa de las muestras. Finalmente, nuestras muestras fueron usadas como sustrato base para probar dos aplicaciones diferentes, la primera fue inducir una característica antibacteriana mediante la deposición de nanopartículas de plata y la segunda fue inducir una característica más bioactiva mediante deposiciones de hidroxiapatita por electrodeposición pulsada. Respecto a los estudios de variación de los parámetros de anodizado nuestros resultados mostraron una relación directa entre la tensión de anodizado y el diámetro de los tubos. Por otra parte, la rugosidad superficial del sustrato de Ti afectó significativamente la geometría final de los NT de TiO_2 . La limpieza mediante solución de HCl 0,1 M eliminó los restos de óxido de la superficie nanotubular mientras que la limpieza con ultrasonidos causó daños en la capa nanotubular. El tratamiento térmico de los sustratos de Ti con NT de TiO_2 amorfo resultó en fase anatasa a 450°C y en una mezcla de anatasa y rutilo a 650°C . Respecto a la acción antibacteriana, las muestras mostraron no tener actividad antibacteriana por si solas, por lo cual se les depositó en su superficie nanopartículas de plata para introducir esta característica. Los marcadores biológicos para determinar la respuesta osteoblástica indicaron que sí existe interacción, crecimiento y proliferación en las muestras estudiadas, habiendo una proliferación aumentada para muestras con ambos tipos de modificaciones (micro y nanométricas). Las imágenes MEB evidenciaron un crecimiento aumentado de filopodios por parte de los osteoblastos en presencia de los microcanales y de los NT de TiO_2 , estos últimos demuestran funcionar como sitios de agarre mejorando la adhesión inicial y aumentando la proliferación. En conclusión, esta tesis sugiere que las muestras de Ti grado médico con una modificación superficial en micro y nanoescala, con microcanales y NT de TiO_2 respectivamente, presentan un efecto aumentado en la proliferación celular debido al efecto sinérgico de ambas rugosidades. Esto se debe a que la presencia de los microcanales aumenta la superficie expuesta lo que mejora la adhesión y anclaje inicial, mientras que la presencia de NT de TiO_2 estimula la formación de filopodios que luego servirán para mejorar la adhesión tomando como puntos de agarre los huecos de los NT de TiO_2 . Por lo que este sistema resulta prometedor para soluciones clínicas actuales en el área de implantes médicos.

*Para mamá, papá y
Nabu*

Agradecimientos

A mis padres, Mara y Héctor, y a mis hermanas, Faty y Laly, por el incondicional apoyo, compañía y empuje en todas mis decisiones. A mi tía Mary y tía Maga por su amor y contención.

A Emmanuel y Nabu por hacer que mi vida tenga sentido. A mis sobrinos y ahijados, Sol, Benja, Lu, Pato y Nicanor por hacer mis días felices. A Jesús, por siempre estar a mi lado.

A mi Abu René y Abu Sara que desde arriba me siguen acompañando en cada logro.

A mi directora Dra. Andrea Rodríguez y co-director Dr. David Comedi por su apoyo constante, motivación, aliento y por encima de todo, su disponibilidad y paciencia en la orientación del trabajo realizado, además de su contención a nivel personal brindado desde el primer día.

A los integrantes de mi laboratorio, “el LAMEIN”, Carmelo, Ross, Andrea, Fer, Ana Lia, Gabriel por su dedicación y criterio a lo largo de estos años. A las chicas y a los chicos, Pau Nanni, Leila, Pau Moreno, Ceci, Nilda, Carla, Mariana, Gaby Rodríguez, Roberto, Martín, Matías, Gaby Pizá, Facu, Jorge y Pablo por su amistad, afecto y por hacer este camino más agradable. En especial a Lu Sappia y Bet Felice, por los días y noches de desvelo compartidos, por las interminables aventuras, por su curiosidad, empuje y eternas discusiones. Por ser amigos incondicionales, esta tesis también es de ellos.

A los miembros y amigos del LAFISO, por siempre facilitarme los medios para llevar a cabo mis actividades. Al Dr. Nicolás Nieva y al Prof. BUF Horacio Brizuela, de manera especial y sincera por su dedicación, predisposición constante, por su criterio y confianza en mi trabajo.

Al personal de apoyo del LAMEIN, Felix Colomo, Mercedes López y a Luciano Martinez, técnico del Centro de Microscopia CIME, por las horas dedicadas y compartidas y por su gran calidez. A Mary y Rafa por su calidez y cariño constante.

A mis estudiantes Clara, Fede, Agustin, Germán y Erica por su ayuda, compañía y por haberme enseñado a ser una mejor supervisora.

A Yi, Noni, Ceci y a mis amigas de hockey por su apoyo incondicional y desinteresados consejos, por ser mi cable a tierra.

A la Dra. Maria Laura Tereschuk y Dra. Monica Tirado, por su desinteresada colaboración y por haber proporcionado instrumental y equipamiento para llevar a cabo este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
OBJETIVOS.....	1
1. Estado del Arte.....	2
2. Fabricación y caracterización de los nanotubos de titania.....	24
2.1. Introducción	24
2.2. Materiales y Métodos	38
2.3. Resultados y Discusión	46
2.4. Conclusión	75
3. Evaluación de la actividad antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> de muestras microacanaladas	76
3.1. Introducción	76
3.2. Materiales y Métodos	81
3.3. Resultados y Discusión	88
3.4. Conclusión	99
4. Evaluación de la respuesta celular de hFOB frente a nanotubos de titania.....	100
4.1. Introducción	100
4.2. Materiales y Métodos	103
4.3. Resultados y Discusión	107
4.4. Conclusión	116
5. Nanotubos de TiO ₂ recubiertos con hidroxiapatita nanoestructurada.....	117
5.1. Introducción	118
5.2. Materiales y Métodos	124
5.3. Resultados y Discusión	128
5.4. Conclusión	135
6. Análisis General.....	136
6.1. Conclusión	136
6.2. Proyecciones	137
Referencias	138
Anexo A: Publicaciones y Patentes	160

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. 1. Clasificación de los biomateriales.....	3
Tabla 1. 2. Factores esenciales que influyen en una buena osteointegración	7
Tabla 1. 3. Clasificación de los grados de pureza del Ti c. p., según norma ASTM F67-00, para aplicaciones biomédicas.....	9
Tabla 1. 4. Propiedades mecánicas de Ti c. p. requeridas para aplicaciones biomédicas, según norma ASTM F67-00.	9
Tabla 1. 5. Propiedades que caracterizan la superficie de un implante	13
Tabla 1. 6. Clasificación más comunes de las modificaciones superficiales	15
Tabla 1. 7. Implantes dentales de uso común en Argentina	19
Tabla 2. 1. Clasificación de capas nanotubulares según el tipo de electrolito usado en el proceso de anodizado.....	30
Tabla 2. 2. Comparación de tamaños de granos de los abrasivos más usados para preparar Ti según distintas normas.....	33
Tabla 2. 3. Influencia de la rugosidad superficial en la morfología de los NT de TiO_2	40
Tabla 2. 4. Diferentes métodos de limpieza de las muestras de nanotubos de TiO_2	41
Tabla 2. 5. Efecto del tratamiento térmico por 3 h sobre la capa de nanotubos de TiO_2	42
Tabla 2. 6. Efecto de la concentración de la solución de trabajo.....	43
Tabla 2. 7. Efecto del voltaje de anodizado en el diámetro de los NT de TiO_2	44
Tabla 2. 8. Estudio de la incorporación de una microrugosidad en forma de microcanales a las muestras previo al anodizado	44
Tabla 2. 9. Comparación entre los dos métodos más comúnmente usados para síntesis de nanotubos de TiO_2	47
Tabla 2. 10. Valores de rugosidad de las superficies tratadas con distintos abrasivos	48
Tabla 2. 11. Desviaciones Raman de muestras recocidas	64
Tabla 2. 12. Comparación de antecedentes bibliográficos de desviaciones Raman presentes en NT de TiO_2 con recocido a distintas temperaturas en atmósfera de aire	64
Tabla 2. 13. Comparación entre los valores experimentales y teóricos del diámetro de los nanotubos de TiO_2	70
Tabla 2. 14. Valores de rugosidad de las superficies tratadas con distintos abrasivos para lograr microcanales.....	74
Tabla 3. 1. Resumen de los grupos muestrales acorde a los diferentes tratamientos superficiales realizados	82
Tabla 3. 2. Ingredientes y sus respectivas concentraciones para caldo LBM	83
Tabla 3. 3. Ingredientes y concentraciones respectivas para placas de agar LBM	83
Tabla 3. 4. Ingredientes y concentraciones respectivas para PBS	83
Tabla 3. 5. Factores de dilución respecto a las diluciones realizadas	87
Tabla 3. 6. Descripción de los cambios realizados en el protocolo propuesto por la norma ISO 22.196 para el análisis antibacteriano de muestras de Ti.....	88
Tabla 4. 1. Muestras utilizadas para ensayo in vitro con células hFOB.....	104
Tabla 4. 2. Caracterización de la topografía de los sustratos usados en ensayo con hFOB.....	107
Tabla 5. 1. Métodos más comunes para la deposición de HA.....	119
Tabla 5. 2. Longitud media de nanobarras de fosfatos cálcicos producidas a distintas temperaturas de deposición	129
Tabla 5. 3. Longitud media de nanobarras de fosfatos cálcicos producidas a distintos tiempos de deposición.	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1. Esquema de niveles en la estructura ósea.....	5
Figura 1. 2. La Osteoinducción.....	7
Figura 1. 3. Secuencia de eventos al colocar un biomaterial en el cuerpo humano.....	10
Figura 1. 4. Representación esquemática de un diente comparado con un implante dental.....	12
Figura 1. 5. Escalas de modificaciones superficiales de un implante dental endoóseo.....	18
Figura 2. 1. Esquema de una celda electroquímica de dos electrodos empleada en los procesos de anodizado.....	25
Figura 2. 2. Esquema del tipo de morfologías obtenidas mediante anodizado: a) Iones del metal que se disuelven en el electrolito.	26
Figura 2. 3. Esquema del perfil de corriente durante la formación de NT de TiO ₂	28
Figura 2. 4. Esquema de la influencia de los parámetros de anodizado en la morfología de estructuras nanotubulares de TiO ₂	29
Figura 2. 5 Estructuras cristalinas de TiO ₂ , Anatasa, Rutilo y Brookita	35
Figura 2. 6. Ti anodizado y con tratamiento térmico.	36
Figura 2. 7. Ti oxidado térmicamente	36
Figura 2. 8. Sustratos incluidos.....	38
Figura 2. 9. Muestras de titanio	48
Figura 2. 10. Imágenes MEB de muestras de Ti con diferentes condiciones de pulido mecánico y respectivo pulido químico.....	50
Figura 2. 11. Imágenes MEB de NT de TiO ₂ fabricados en sustratos de Ti con distintos tipos de pulido inicial	51
Figura 2. 12. Efecto del pulido previo al anodizado	52
Figura 2. 13. Imágenes MEB de muestras (a) Grupo IV y (b) Grupo V	53
Figura 2. 14. Micrografías MEB de muestras sonicadas a distintos tiempos.....	55
Figura 2. 15. Fotografías de muestras sonicadas a distintos tiempos	56
Figura 2. 16. Imágenes MEB de muestras sin (Grupo XI) y con (Grupo XII) el protocolo de limpieza en solución 0,1 M de HCl, (a) y (b) respectivamente.	57
Figura 2. 17. Fotografías de muestras anodizadas sin y con tratamiento térmico.....	59
Figura 2. 18. Micrografías ópticas de muestras anodizadas sin y con tratamiento termico.	59
Figura 2. 19. NT de TiO ₂ anodizados a 0,5% de HF, 20V, por 10 minutos y posterior tratamiento térmico a 450 °C por 3 h.....	61
Figura 2. 20. Micrografías MEB para muestras sin y con tratamiento termico	62
Figura 2. 21. Espectros Raman de recubrimientos de titania	63
Figura 2. 22. Imágenes de las posiciones exactas donde se hizo incidir el láser sobre la muestra ...	64
Figura 2. 23. Micrografías de las superficies de TiO ₂ para muestras con distintas concentraciones de HF	65
Figura 2. 24. Diagrama esquemático de las etapas de crecimiento de los NT de TiO ₂ mediante anodizado.....	66
Figura 2. 25. Microfotografías de los nanotubos de TiO ₂ y su variación con el voltaje	69
Figura 2. 26. Efecto del voltaje de anodizado en el diámetro de los NT de TiO ₂	70
Figura 2. 27. Composición química de los nanotubos de TiO ₂ anodizados a 20V, 0,5% en peso de HF por 10 minutos..	71
Figura 2. 28. Fotografías de los microcanales tomadas con un microscopio metalográfico	72
Figura 2. 29. Fotografías tomadas con el microscopio metalográfico para las muestras de Ti tratadas con diferentes lijas.	73
Figura 3. 1. Esquema de las principales etapas de la evaluación antibacteriana.....	84

Figura 3. 2. Esquema de inoculación de la muestra de Ti	85
Figura 3. 3. Recuperación del material biológico sobre las muestras luego de haber sido incubadas a 37°C.	85
Figura 3. 4. Proceso secuencial de dilución.	86
Figura 3. 5. Esquema de división de las placas de Petri con medio LBM agar para plaqueo e incubación.	86
Figura 3. 6. Gráfico de cajas representando el valor promedio de la rugosidad para las superficies trabajadas con diferentes lijas.	89
Figura 3.7. Micrografías MEB de las muestras microacanaladas previo al anodizado con una magnificación de 500X, a) L100, b) L180, c) L320, d) L600 y e) pulido alumina 0,3 μm	90
Figura 3. 8. Evaluación del efecto antibacteriano de los microcanales en superficies de titanio de 5x5mm ²	91
Figura 3. 9. Micrografías SEM de las muestras microacanaladas posterior a la incubación por 24 h a 35°C	92
Figura 3. 10. Foto tomada por el MEB de una muestra de Ti pulido anodizado a 20 V y con deposición de plata. En la imagen se observan las partículas de Ag resaltadas en color rojo.....	93
Figura 3. 11. Micrografías del MEB de las muestras microacanaladas con posterior anodizado a 20V y deposición de NP de Ag. Se muestran los grupos diferentes L100, L180, L320, L600 y pulido con alúmina 0,3 micras a distintas magnificaciones.	95
Figura 3. 12. Caracterización composicional de muestras de Ti con microcanales y NT de TiO ₂ depositadas con NP de Ag mediante fotoreducción con UV.	95
Figura 3. 13. Fotografía de una placa de Petri luego de la etapa de incubación, muestra el número de UFC contadas.....	96
Figura 3. 14. Evaluación del efecto de los microcanales en combinación con los NT de TiO ₂ depositados con NP de Ag.....	97
Figura 4. 1. Esquema del sistema de medición de ángulo de contacto montado en el laboratorio.....	106
Figura 4. 2. Diferentes rugosidades en escala micro y nanométrica para muestras sin y con microcanales (L180) y muestras sin y con anodizado a 20V	108
Figura 4. 3. Proliferación de hFOB sobre sustratos metálicos	110
Figura 4. 4 Actividad de la FA de células hFOB sobre muestras metálicas.	112
Figura 4. 5. Microfotografías de las células hFOB sobre las muestras metálicas estudiadas	114
Figura 4. 6. Interacción entre los filopodios de las hFOB y las estructuras nanotubulares	115
Figura 4. 7. Análisis de humectabilidad de las muestras metálicas estudiadas.....	116
Figura 5. 1. Celda electrolítica tripolar. CE: contra-electrodo, RE: electrodo de referencia y WE.....	120
Figura 5. 2.. Esquema de una secuencia bipolar de pulsos de corriente	122
Figura 5. 3. Proceso de electrodeposición pulsada.....	125
Figura 5. 4. Forma de onda esquemática de corriente aplicada durante el proceso de electrodeposición.....	125
Figura 5. 5. Deposición controlada por corriente usando la solución de trabajo con precursores de hidroxiapatita	128
Figura 5. 6. Micrografías MEB de deposiciones realizadas a distintas temperaturas.....	130
Figura 5. 7. Longitud de nanobarras de fosfatos cálcicos en función de la temperatura de deposición	131
Figura 5. 8. Micrografías MEB de deposiciones realizadas a distintos tiempos de deposición.	132
Figura 5. 9. Longitud de nanobarras de fosfatos cálcicos en función del tiempo de deposición	133

Figura 5. 10. Estudio composicional de una muestra depositada por corriente pulsada	134
Figura 5. 11. Espectro Raman del recubrimiento obtenido. La fuerte banda a 962 cm^{-1} corresponde a un modo vibracional entre P-O del tetraedro PO_4^{3-}	135

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo principal de la presente tesis es la funcionalización de la superficie de Ti mediante nanoestructuras tubulares de TiO_2 para favorecer y acelerar la osteointegración de implantes de Ti.

Objetivos específicos

- Diseño, fabricación y optimización de estructuras micrométricas y nanométricas en sustratos de Ti grado médico
- Evaluación de la actividad antibacteriana de los sistemas desarrollados frente a *Staphylococcus aureus*
- Evaluación de la respuesta biológica de células osteoblásticas frente a los sistemas fabricados

HIPOTESIS

La osteointegración de implantes de Ti se ve favorecida por el aumento de la proliferación osteoblástica mediante el control de la geometría superficial.

1. Estado del Arte

En este capítulo se realizará una introducción sobre los conceptos básicos involucrados con la temática estudiada, tales como: definición de implante médico, con especial énfasis en los implantes dentales, material del implante y modificaciones en su superficie, biología del tejido óseo y osteointegración, además, se resumirán las características de los implantes actualmente disponibles en el mercado.

Generalidades

El aumento en la expectativa de vida del ser humano ha propiciado que las ciencias contemporáneas se dediquen cada vez más a la solución de patologías o traumas de escasa mortalidad asociada, pero de alta morbilidad y con gran incidencia en la estética, capacidad funcional y calidad de vida del individuo. Desde el punto de vista del mercado, la aparición y consolidación de nuevas, sofisticadas y seguras técnicas quirúrgicas, en conjunto con los factores ya enunciados, han provocado una creciente demanda en prótesis, implantes, sistemas y dispositivos médicos, que tienen que desempeñar sus funciones en contacto con los tejidos existentes en el cuerpo humano. Esta alta demanda se extiende a los materiales de los que están constituidos dichos dispositivos médicos, es decir, a los biomateriales.

Los biomateriales se clasifican internacionalmente dentro de los llamados equipos, dispositivos y materiales médicos. Así, según la norma ISO 10993-1:97(E), un biomaterial es cualquier material natural o sintético de tipo polimérico, metálico, cerámico, o compuesto, incluyendo los tejidos no viables, utilizado como dispositivo médico o que forme parte de él. Entre los propósitos que cumplen estos dispositivos están, entre otros, tratar, aumentar y/o reemplazar cualquier tejido o función del cuerpo, para lo cual los biomateriales permanecen en contacto directo con los tejidos y fluidos biológicos. Además, un material biocompatible puede ser bioinerte (no es tóxico ni es biológicamente activo durante su vida en servicio), o bioactivo (tampoco es tóxico, pero en cambio sí es biológicamente activo durante su vida en servicio). En la tabla 1.1 se muestra una clasificación de los biomateriales atendiendo a diferentes criterios.

Por todo lo anteriormente expuesto, los requisitos esenciales de un biomaterial son su biocompatibilidad y biofuncionalidad. Por biocompatibilidad se entiende la aceptabilidad biológica del material por el organismo del paciente, es decir que al estar en contacto con el tejido biológico no se produzca una reacción de rechazo, la cual puede variar desde una inflamación crónica hasta una futura formación de tumores. Por otro lado, por biofuncionalidad se entiende la capacidad del material de desencadenar una respuesta benéfica del organismo receptor para el funcionamiento óptimo del dispositivo médico. La misma está relacionada con el diseño y las propiedades mecánicas del implante, por ejemplo si el diseño de un implante posee bordes o esquinas afiladas y si además no está pulido o presenta agujas en su superficie, entonces causará daño en el cuerpo implantado aunque este sea de un material biocompatible. Por lo cual, para demostrar el cumplimiento de estos requisitos, todo biomaterial debe ser sometido a una evaluación físico-química, biológica y clínica, estandarizadas bajo normas nacionales o internacionales, previo a ser utilizado y distribuido en la sociedad.

El dominio de los biomateriales es muy extenso y está en continuo desarrollo a la vez que incluye varios aspectos de las ciencias de los materiales, médicas, químicas, biológicas y físicas.

Existen numerosos biomateriales que pueden ser utilizados en el cuerpo humano, tales como metales (por ejemplo acero inoxidable, aleaciones de cobalto, aleaciones de titanio), cerámica (óxido de aluminio, zirconia, fosfatos cálcicos) y polímeros sintéticos y naturales [1]. Entre éstos, el titanio (Ti) y aleaciones de titanio son considerados como algunos de los biomateriales más significativos, debido a su resistencia a los efectos de los fluidos corporales, gran resistencia a la tracción, alta resistencia a la corrosión y alta biocompatibilidad, lo que los hace adecuados para aplicaciones médicas [2]. Por ello, el Ti comercialmente puro (Ti c.p.) es el material dominante utilizado para implantes dentales mientras que para aplicaciones ortopédicas se utiliza, tanto el Ti c.p. como la aleación Ti-6Al-4V [3]. En este capítulo se estudiarán los fundamentos de la biología del tejido óseo y el proceso de osteointegración, los tratamientos superficiales del titanio y sus aleaciones, incluyendo métodos prometedores para obtener nanotopografías como ser el anodizado electroquímico para la formación de estructuras nanotubulares de TiO₂, todos ellos con fines de aplicaciones biomédicas; finalmente se realizará un resumen acerca de las marcas de implantes dentales más empleadas en la Argentina, ya sean importadas como de origen nacional.

Tabla 1. 1. Clasificación de los biomateriales

Clasificación de los biomateriales de acuerdo con ...	Composición química	-Metálico -Polimérico -Cerámico -Compuesto
	Aplicación real	-Implantable (ortopédicos y vasculares) -No implantable (sondas, catéteres, globos angioplásticos)
	Tiempo de permanencia	-Temporal: En general son extraídos cuando el proceso biológico reparativo ha terminado, puesto que el hueso es capaz de soportar las exigencias habituales sin su auxilio -Permanente: Se emplea para reemplazar total o parcialmente un hueso o una articulación irreparablemente dañados en su morfología, estructura o función
	Función	-Soporte -Diagnóstico -Tratamiento
	Estructura	-Sólidos -Porosos
	Interacción con el tejido circundante	-1º Generación: son bioinertes. Son aquellos en los que se busca una combinación adecuada de las propiedades físicas iguales a las del tejido reemplazado con la mínima respuesta tóxica. -2º Generación: son bioactivos o bioabsorbibles. Pueden ser bioactivos con el objetivo de producir una acción y reacción

		<p>controladas en el entorno fisiológico o absorbibles con el objetivo que se produzca una absorción controlada del biomaterial, que es reemplazado por tejido del huesped</p> <p>-3º Generación: Son bioactivos y bioabsorbibles. Son aquellos que buscan estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular, modulan la respuesta celular</p> <p>-4º Generación: Son biomiméticos. Estimulan la reparación por procesos fisiológico, estimulan células específicas para ayudar al cuerpo a curarse y a reparar sus propios tejidos de manera natural siguiendo procesos fisiológicos [4], [5]</p>
	Origen	<p>-Natural</p> <p>-Sintético</p>

Tejido óseo y osteointegración

La manera más efectiva de entender lo que es un biomaterial es conociendo los requerimientos que debe cumplir para ser aplicado satisfactoriamente, los cuales están determinados por la naturaleza del tejido que quiere reemplazar y su entorno.

Biología del tejido óseo

Desde un punto de vista histológico, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso. Ambos están constituidos por osteonas. El hueso cortical se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos. El hueso trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se encuentra médula ósea [6]. Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral.

El hueso posee una arquitectura orgánica-inorgánica altamente compleja; siendo sus principales componentes orgánicos el colágeno tipo I aunque también encontramos colágeno tipo III y tipo IV, todos ellos responsables de la rigidez, viscoelasticidad y dureza del hueso; mientras que su componente inorgánico principal es la HA, responsable también de la rigidez, esfuerzo mecánico y homeostasis mineral [7], [8]. Existe una estructura jerárquica del hueso la cual puede ser clasificada en diversos niveles como macroestructura (hueso trabecular y cortical), microestructura (sistemas Haversianos, osteones, laminillas), nanoestructura (fibrillas de colágeno y los minerales embebidos en ella) y subnanoestructura (estructura molecular de los elementos constituyentes como los minerales, colágeno y proteínas no colagénicas[7], [9], ver figura 1.1.

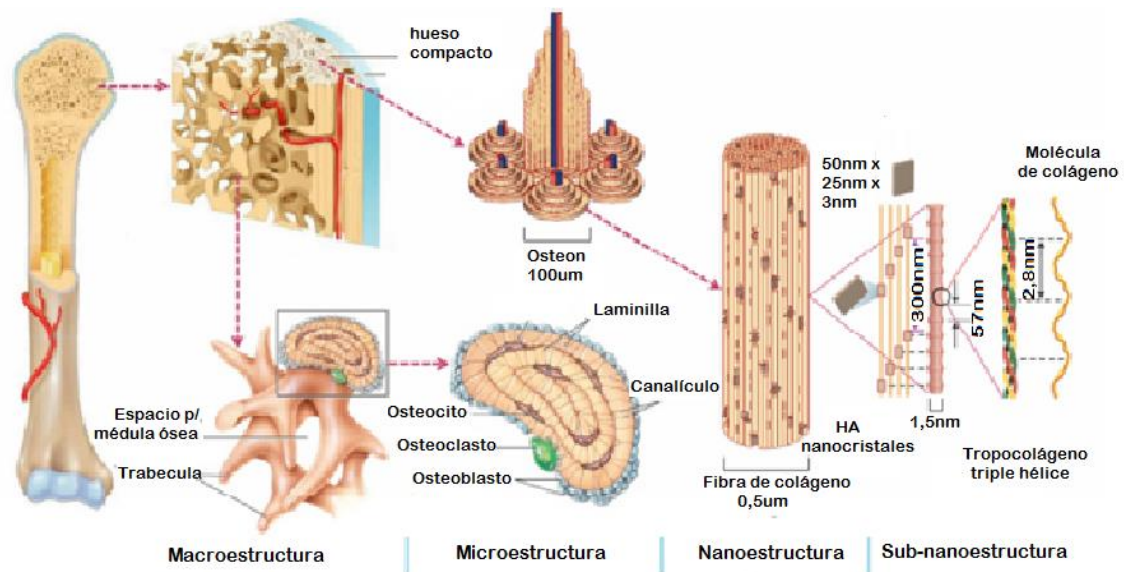


Figura 1. 1. Esquema de niveles en la estructura ósea. Imagen adaptada de [7]

A nivel macroscópico se observa la forma total del hueso. El hueso puede ser clasificados como hueso compacto (hueso cortical) y hueso trabecular (hueso esponjoso). El hueso compacto es casi completamente sólido, con sólo ~3-5% de espacios para osteocitos, canalículos, vasos sanguíneos, etc. En cambio, el hueso trabecular posee poros que están llenos de médula ósea con una porosidad que varía entre 50-90% [9], [10]. El bloque de construcción del hueso compacto es el osteón, su tamaño varía de 10 a 500 μm , mientras que el hueso trabecular está hecho de una red de trabéculas. En las micro y nano-escalas, el colágeno tipo I y la HA forman fibras de colágeno mineralizadas las cuales están dispuestas formando laminillas de 3-7 μm de espesor que se apilan formando ángulos de 45° entre sí. En hueso maduro, estas laminillas se agrupan concéntricamente (3-8 laminillas) alrededor de lo que se conoce como Canal Haversiano, una estructura cilíndrica que corre paralelamente al eje del hueso [9], [11], [12]. El hueso trabecular consiste en una red de trabéculas interconectadas. A nivel sub-nanoestructural, los tres materiales principales son los cristales minerales, las moléculas de colágeno y las proteínas no colagénicas [9], [11], [12].

La matriz ósea mineralizada contiene tres tipos de células óseas activas: osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. Los primeros, asociados a la síntesis ósea; los segundos, a la reabsorción ósea; y los terceros, asociados al sistema de mecano-transducción necesario para la remodelación ósea. Además, células progenitoras están presentes en la médula ósea que rellena el canal intramedular y los espacios intertrabeculares [11].

El hueso es el único tejido del organismo capaz de regenerarse, permitiendo la restitución total tras un trauma. Cuando se produce una fractura, se coloca un implante osteointegrado o se realiza un injerto para aumentar el sustrato óseo antes de la inserción de implantes, lo que se pretende es la regeneración ósea, es decir, la formación de hueso nuevo que, tras un proceso de remodelado, sea idéntico al preexistente. Básicamente, las etapas son: a) formación precoz de un hematoma que involucra sangrado y coagulación, b) degradación del coagulo y transformación del hematoma en callo óseo, lo cual permite que el hueso, lesionado con sus partes inicialmente necróticas, se regenere con los fenómenos de revascularización y remodelación ósea y c) condición de osteointegración, cuando la estructura ósea se mantiene en contacto íntimo con la superficie del implante [13], [14]. El hueso es considerado un tejido

dinámico en constante formación y reabsorción. El remodelado óseo consiste en la reabsorción de una cantidad determinada de hueso llevada a cabo por los osteoclastos, así como la formación de la matriz osteoide por los osteoblastos y su posterior mineralización. Este fenómeno normalmente tiene lugar en pequeñas áreas de la superficie cortical o trabecular, llamadas "unidades básicas de remodelado óseo".

Osteointegración

De acuerdo a Brånemark [15], la osteointegración se define como la conexión directa estructural y funcional entre el hueso vivo, ordenado, y la superficie del implante sometido a carga funcional [16]. Lo cual pone de manifiesto que la creación y el mantenimiento de la osteointegración dependen de las capacidades de cicatrización, reparación y modelación del tejido óseo que circunda el implante.

El éxito de este proceso depende de la función de dos procesos previos: la osteoinducción y la osteoconducción. Por osteoinducción se entiende el proceso a través del cual las células madre se diferencian en células osteogénicas que forman el tejido óseo, figura 1.2. (a). La deposición de nuevo hueso por parte de estas células se conoce como osteogénesis, figura 1.2. (b). Existen dos tipos de osteogénesis: osteogénesis a distancia y osteogénesis de contacto [17]. En la primera, el tejido óseo se forma desde la superficie del hueso circundante. En la segunda, la formación de tejido óseo se produce desde la superficie del implante, figura 1.2. (b). Es decir, la formación de hueso en la región periprotésica tiene dos direcciones: desde la superficie del hueso circundante hacia el implante y desde la superficie del implante hacia el hueso circundante. En la mayoría de los casos la curación del tejido óseo peri-implantario es una combinación de ambos mecanismos, mientras que el mecanismo predominante determina una integración o encapsulación del implante en el tejido óseo.

Sin embargo, y a pesar de que la osteogénesis de contacto forma tejido óseo a una velocidad 30% mayor que la osteogénesis a distancia, la formación desde la superficie del implante implica que dicha superficie permita su colonización por parte de células de origen mesenquimal. Esta colonización, denominada osteoconducción, corresponde a la formación de hueso sobre la superficie del implante [18], figura 1.2. (c). Este fenómeno depende esencialmente de la biocompatibilidad del material y de sus características superficiales [19]. Como consecuencia de la colonización de la superficie del implante por parte de las células osteoprogenitoras, se forma una interfase de contacto entre el implante y los tejidos que lo rodean. Este contacto puede ser de dos tipos: el contacto con el hueso o tejido duro, y el contacto con el tejido fibroso o suave. Se ha reportado que el contacto directo entre el hueso vivo y la superficie del implante forma una fuerte matriz extracelular de unión tanto estructural como funcional que incrementa con el tiempo, promueve la osteogénesis reparativa en la interfase y permite la fijación del implante gracias a su mineralización [20]. En el caso de la interfase con el tejido suave, se ha reportado que las células epiteliales forman un fuerte collar alrededor del implante que carece de signos de respuesta inflamatoria y que crea una fina capa de tejido conectivo poco vascularizada en las cercanías de la superficie del implante a partir de la cual comienza la regeneración tisular [21].

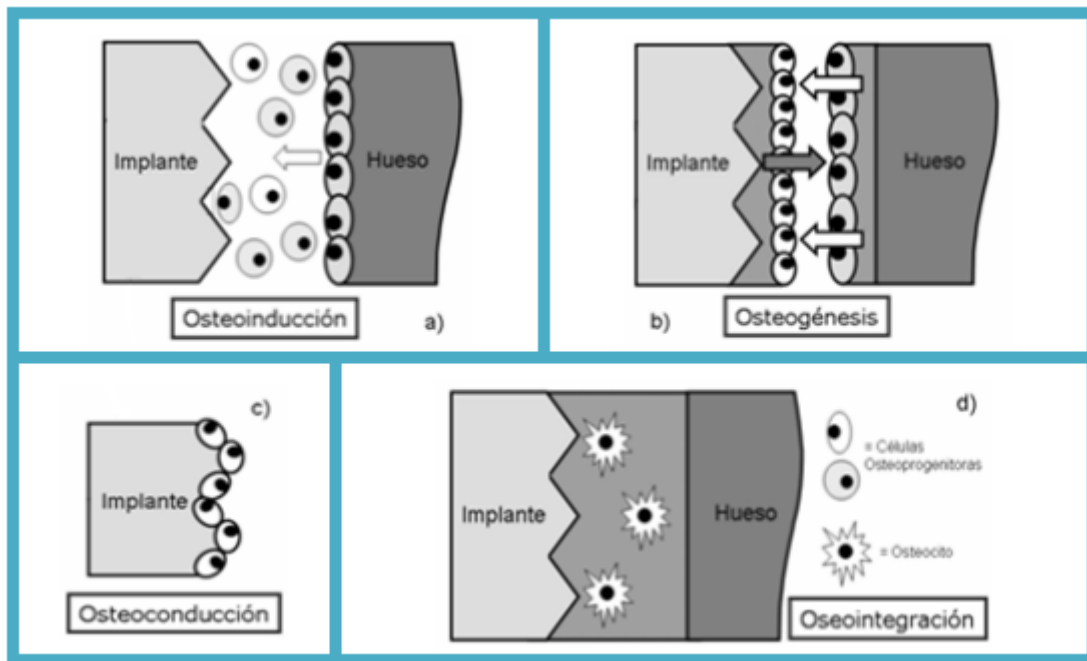


Figura 1. 2. La Osteoinducción (a) permite la diferenciación de las células osteoprogenitoras. La osteogénesis (b) es causada por células osteoprogenitoras que alcanzan la superficie del implante (osteogénesis de contacto, flecha gris) y por células osteoprogenitoras que proliferan desde el borde del hueso (osteogénesis directa, flechas blancas). Estas células que proliferan colonizan la superficie del implante durante la denominada osteoconducción (c). La adecuada formación y viabilidad del hueso (presencia de osteocitos) alrededor del implante permite que exista osteointegración (d) en la interfase hueso-implante. Adaptada de [14]

Seis factores fueron propuestos como esenciales para conseguir una buena osteointegración [22], los cuales en la actualidad constituyen la base de una buena práctica clínica e ingeniería en la implantología dental.

Tabla 1. 2. Factores esenciales que influyen en una buena osteointegración

Factores	Factores que dependen del implante	Material del implante
		Calidad superficial del implante
		Diseño macroscópico y dimensional del implante
	Factores que dependen del control clínico	Condiciones del paciente y estado del hueso receptor
		Técnica quirúrgica
		Condiciones de carga del implante

En el caso particular de biomateriales para el reemplazo de hueso, se debe tener en cuenta que el material a reemplazar es un tejido denominado duro, con una rigidez relativamente baja (11 a 20 GPa, según la dirección y una resistencia mecánica longitudinal de unos 130 MPa [9], de la cual es responsable fundamental la hidroxiapatita (HA) que es su fase mineral. Las fibras de colágeno, esencialmente tipo I, sirven de sustrato de la fase mineral, equilibrando su baja elasticidad y tenacidad. La fase viva del hueso la representan varios tipos de células (osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y de revestimiento) en una matriz extracelular compuesta fundamentalmente por colágeno tipo I. La complejidad de la estructura del hueso

es la responsable de su comportamiento mecánico particular: anisótropo, heterogéneo, no lineal, viscoelástico y termo-reológicamente complejo. A todo esto, se debe sumar la presencia de un ambiente fisiológico circundante altamente agresivo. Cabe destacar que las propiedades mecánicas antes mencionadas de hueso cortical o compacto, capa exterior del hueso, cambian drásticamente en el caso del hueso trabecular o esponjoso, capa interna del hueso.

Por tanto, el material candidato para el reemplazo de hueso debe ser resistente a la corrosión en el ambiente fisiológico, biocompatible, bioadherente (que permita el crecimiento de hueso en contacto directo), biofuncional (especialmente resistencia a fatiga y módulo de Young cercano al del hueso) y disponible. Por esta razón, actualmente el titanio y sus aleaciones son los materiales más ampliamente usados para el reemplazo de hueso [23].

Titanio y aleaciones de titanio en aplicaciones médicas

La creciente demanda de los implantes metálicos en la sociedad ha estado contribuida principalmente por:

- 1- Limitada disponibilidad, inmuno-rechazo y otros aspectos relacionados con los trasplantes que han hecho que las necesidades sean suplidas en muchos casos por implantes.
- 2- Rápido crecimiento de la población mayor de 50 años debido a la mayor expectativa de vida y al crecimiento de la población mundial.
- 3- En el caso del hueso, progresivo deterioro de la calidad del tejido conectivo con la edad, especialmente a partir de los 30 años.
- 4- Aumento de la fiabilidad de implantes y prótesis, corroborada por cirujanos y pacientes.
- 5- Aumento de la importancia de la estética personal en los individuos de una sociedad.
- 6- Mejora de habilidades quirúrgicas, equipos e instalaciones hospitalarias para llevar a cabo las cirugías y tratamientos relacionados.
- 7- Normas internacionales y regulaciones gubernamentales que aumentan la fiabilidad de los implantes y prótesis.

Los materiales metálicos han sido usados en aplicaciones médicas por más de 50 años. El Ti y sus aleaciones son actualmente utilizados en aplicaciones dentales siendo el Ti c.p. el material dominante en este tipo de aplicaciones como una alternativa a la anteriormente usada aleación de Ag-Pd-Au-Cu, no solo porque posee excelentes propiedades si no por tener un costo menor que el Pd. Otras aleaciones reportadas para implantes dentales son Ti-6Al-7Nb, Ti-6Al-4V, Ti-13Cu-4.5Ni, Ti-25Pd-5Cr, Ti-20Cr-0.2Si [23]. Además de huesos artificiales, reemplazo de articulaciones y de implantes dentales, el titanio también es utilizado en implantes cardiovasculares como por ejemplo en válvulas cardíacas, protectores para marcapasos, corazones artificiales y dispositivos circulatorios. Debido a sus propiedades de ser inerte, fuerte y no magnético, algunas aleaciones como aleación de níquel-titanio (Nitinol) son usadas también en equipos de resonancia magnética, los cuales son una herramienta de diagnóstico muy potente. Actualmente, también existen stents de nitinol, usados en tratamientos de enfermedades cardiovasculares que, durante su fabricación, normalmente son cubiertos con una capa de carbono para aumentar su biocompatibilidad [24].

El titanio se encuentra entre los diez elementos más abundante en la corteza terrestre y se obtiene a partir de minerales ricos en óxido de titanio (TiO_2) como son el rutilo y la ilmenita. Las técnicas actuales de extracción y refinado permiten la obtención del metal para la producción de los grados comerciales "c.p." de titanio y aleaciones de base titanio que se usan en aplicaciones biomédicas. En este sentido la *American Society for Testing and Materials*

(ASTM) lo clasifica en cuatro grados de pureza, definidos según la concentración de elementos intersticiales, tabla 1.2 [25]. De esta manera, a medida que aumenta el grado (desde I hasta el IV) aumenta la cantidad de elementos intersticiales (aleantes) y, con ello, como propiedades más significativas, aumenta la resistencia mecánica y disminuye la capacidad de deformación sin fractura, tabla 1.3.

Tabla 1. 3. Clasificación de los grados de pureza del Ti c. p., según norma ASTM F67-00, para aplicaciones biomédicas.

Tipos	Composición química [% en peso]					
Ti c. p.	N máx.	C máx.	H máx.	Fe máx.	O máx.	Ti
Grado I	0,03	0,10	0,0125	0,20	0,18	Balance
Grado II	0,03	0,10	0,0125	0,30	0,25	Balance
Grado III	0,05	0,10	0,0125	0,30	0,35	Balance
Grado IV	0,05	0,10	0,0125	0,50	0,40	Balance

N: nitrógeno, C: carbono, H: hidrógeno, Fe: hierro, O: oxígeno. Fuente: [26]

Tabla 1. 4. Propiedades mecánicas de Ti c. p. requeridas para aplicaciones biomédicas, según norma ASTM F67-00.

Ti c. p.	Resistencia a la tracción [MPa]	Limite elástico [MPa]	Elongación [%]
Grado I	240	170	24
Grado II	345	275	20
Grado III	450	380	18
Grado IV	550	483	15

Fuente: [26]

Teniendo en cuenta el Ti, el módulo de elasticidad (100-110 GPa), el limite elástico (170-483 MPa) y la resistencia a la tracción (240-550 MPa) son valores suficientes para soportar las tensiones mecánicas a las que se verán sometido los implantes en el cuerpo humano. Su bajo módulo de Young es considerado como una ventaja biomecánica ya que un valor bajo del módulo elástico resulta en una menor fuerza de apantallamiento (shielding stress) hacia el hueso comparado con otros implantes metálicos, lo cual repercute en los fenómenos de remodelación ósea, induciendo por tanto una regeneración ósea mas rápida y saludable. Además, los valores de resistencia mecánica excelentes (en relacion con su peso) del Ti c.p., se convierten en un valor agregado a su estabilidad química superficial (resistencia a la corrosión) y a su excelente biocompatibilidad en diferentes medios, especialmente frente a los ambientes fisiológicos. Dichas propiedades están asociadas a la presencia en la superficie de un óxido de titanio (TiO₂) nativo denso y protector que se forma de manera natural en aire o agua a temperatura ambiente y que presenta un espesor de 2-10 [nm] [27], [28]. Esta capa, sumamente impermeable, le confiere una característica ideal para el medio bucal. No obstante, el TiO₂ nativo necesita tiempos muy largos para que se produzca su unión con el hueso yuxtapuesto, lo que podría conducir al fallo del implante [29]. Por esto, el crecimiento de película de TiO₂ controlada se ha convertido en un campo de investigación muy activo [30]. La figura 1.3 resume una serie de eventos que ocurren al implantar un biomaterial dentro del cuerpo humano. En los primeros nanosegundos, son las moléculas de agua las primeras en alcanzar y adherirse a la superficie de acuerdo a las propiedades de mojabilidad de la misma,

ver Fig 1.3a [31]. Posteriormente se incorporan los iones hidratados presentes en el medio biológico (Fig 1.3b), tales como Na^+ y Cl^- , formando la conocida doble capa cuya extensión depende de las propiedades electrostáticas entre la solución y la superficie del implante. Un poco después, se produce la adsorción de proteínas y otras moléculas, Fig 1.3c. Éstas, que también poseen una capa de hidratación superficial interaccionan con el agua adsorbida en la superficie. El equilibrio termodinámico entre ambas capas interfaciales es el que determina la configuración final de las proteínas. Los procesos de adsorción-desorción están controlados por el efecto Vroman [32] que relaciona las propiedades superficiales del material (energía y carga superficial) con la capa adsorbida de proteínas (concentración, conformación y tamaño). En pocos minutos y previo a la interacción con las células, se forma una monocapa de proteínas en la superficie del implante que estará determinada por las propiedades físico-químicas de dicha superficie, figura 1.3d. Posteriormente las células “sentirán” esta capa de proteínas interaccionando a través de las extensiones celulares, membrana celular y proteínas y receptores celulares, Fig 1.3e. De modo que la respuesta implante-células dependerá, en gran parte del tipo de proteínas y su conformación [31].

El resultado de los procesos celulares originados por la naturaleza de las proteínas adsorbidas es lo que se conoce generalmente como “reacción a cuerpo extraño”, que es una forma especial de inflamación no específica. La etapa posterior de reacción a cuerpo extraño está determinada fundamentalmente por la forma y la topografía de la superficie del biomaterial. Finalmente, los materiales inertes quedan rodeados de un tejido fibroso resultante a la reacción de un cuerpo extraño, aislándolo del tejido local.

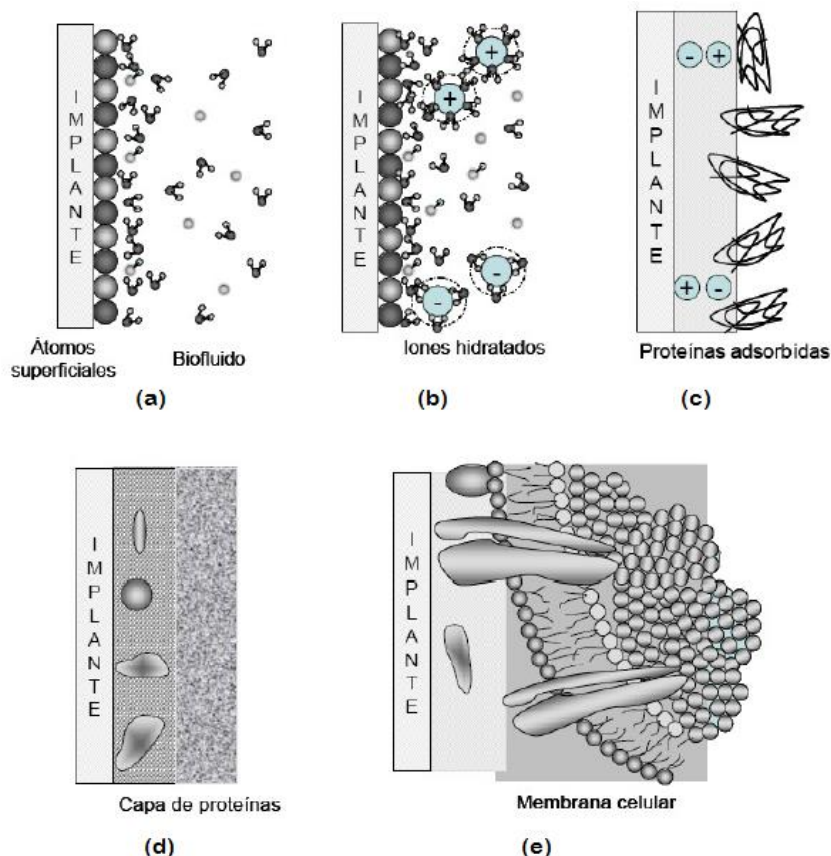


Figura 1. 3. Secuencia de eventos al colocar un biomaterial en el cuerpo humano. Fuente: [31]

Además de los problemas asociados a los materiales y la posibilidad de formación de fibrosis en la intercara tejido-implante, la innegable presencia de microorganismos durante el proceso

de implantación puede desencadenar un problema de infección en la zona circundante a la intervención. En la medida que el espesor de la capa de tejido fibroso sea mayor, la posibilidad de micromovimientos aumenta y, por lo tanto, se ve comprometida la estabilidad mecánica del implante e incluso la osteointegración original del implante. Ahora, en el caso de producirse una infección, esto puede interferir en la función prevista del implante causando una hospitalización prolongada del paciente y complejos procedimientos de revisión. Todo esto tiene un importante papel en el porcentaje de fallo de los implantes de titanio [23], [33], [34]. Según un estudio realizado por Weiss, la tasa de éxito de los implantes endóseos es de un 95% [35] por lo que existe un 5% de implantes que fallan a corto plazo y además, con el paso del tiempo, surgen más problemas biológicos y técnicos, provocando la pérdida de un mayor número de implantes, haciendo necesario el reimplante [36]. Por ello, múltiples investigaciones son llevadas a cabo para modificar la superficie de los implantes de titanio con el objetivo de mejorar la estabilidad a largo plazo disminuyendo las posibilidades de una infección bacteriana y promoviendo una mejor osteointegración e incluso, fomentando un enlace directo con el hueso (fijación bioactiva) evitando la presencia de la fibrosis.

Implante dental

Los implantes dentales representan una opción de tratamiento fiable para asegurar los diversos tipos de prótesis en la rehabilitación oral, parcial o total en pacientes edéntulos. Se han convertido en un procedimiento estándar para el reemplazo de dientes en el área de estética, proporcionando muchas ventajas, pero también retos en pacientes con condiciones clínicas inadecuadas tales como deterioro de la calidad o cantidad de hueso, diabetes mellitus, osteoporosis, etc.

Un implante dental es un dispositivo hecho de un material aloplástico que se aplica, mediante procedimientos de carácter quirúrgico, sobre el reborde residual óseo y que opera como cimiento de la prótesis dental [37]. Los implantes de carácter endoóseos son los más empleados por los odontólogos y considerados como objeto de estudio por la mayor parte de los investigadores. Estos forman parte de la unidad protésica que sustituye el diente por completo y que además del implante se compone del pilar protésico y la prótesis dental, figura 1.4. El implante está en contacto directa y únicamente con el tejido óseo a diferencia del diente normal que lo hace a través del ligamento periodontal, por lo que el pilar protésico prolonga el implante sobre los tejidos blandos mientras que una pieza, denominada juntura se encarga de unir el pilar protésico con la prótesis dental, la cual también hace de corona dental.

El Ti c.p. consiste en el material más ampliamente empleado para implantes endoóseos debido a su excelente biocompatibilidad y sus adecuadas propiedades mecánicas, tal como fue mencionado en la sección anterior. Asimismo, la superficie de los implantes dentales representa un aspecto de relevancia en el diseño ya que la ingeniería aplicada a la misma influye de forma significativa en la respuesta de los tejidos circundantes, incluyendo la osteointegración del Ti c.p. tanto a corto como a largo plazo. Las estrategias más utilizadas para mejorar la respuesta tisular consisten en el aumento de la rugosidad (variación de la topografía) o en la aplicación de recubrimientos bioactivos (cambio en las propiedades físico-químicas). Más adelante se expondrá en detalle los posibles tratamientos superficiales que existen actualmente para los implantes dentales.

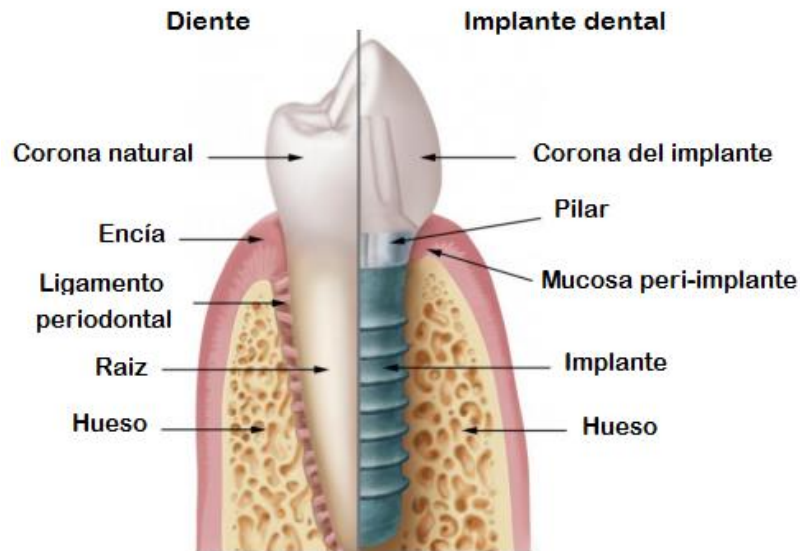


Figura 1. 4. Representación esquemática de un diente comparado con un implante dental. El diente se conecta al hueso a través del ligamento periodontal, el implante se conecta directamente al hueso (osteointegración). Figura adaptada de [38]

El tiempo de cicatrización del tejido óseo después de la inserción de un implante ha sido estimado entre tres y seis meses [22]. Por ello, en general, se considera mejor esperar antes de cargar funcionalmente los implantes entre 3 y 4 meses en el caso de la mandíbula inferior y entre 6 y 8 meses en la superior. No obstante, se está cargando a los implantes solo unas semanas después de su colocación (implantes de carga prematura) [39], [40] o incluso de inmediato (implantes de carga inmediata) [41]. Estas dos últimas técnicas necesitan de un control excesivo para evitar que los micro-movimientos del dispositivo lleven al fracaso del implante dental provocando la formación de una cápsula gruesa alrededor de su superficie de forma permanente [42]. Al presente, lo que se busca es reducir el tiempo de tratamiento, pero para ello se requieren de diseños de implantes y de superficies con gran capacidad para acelerar los procesos de curación y remodelación ósea.

Modificaciones superficiales en el titanio y sus aleaciones

Los diferentes métodos de modificación superficial aplicados en los implantes y prótesis de titanio buscan actuar sobre una o varias de las propiedades que caracterizan la superficie (tabla 1.4.), con el fin de afectar positivamente uno o varios de los factores que determinan la reacción de respuesta del tejido receptor. La justificación clínica para utilizar modificaciones superficiales es la posibilidad de acelerar el proceso de cicatrización y cargar los implantes en menor tiempo que el que se recomienda generalmente para los implantes torneados.

Son muchos los tratamientos que se han aplicado sobre el Ti c.p. para aplicaciones biomédicas, y su descripción se puede abordar desde distintos puntos de vista. Dos posibles clasificaciones se muestran en la tabla 1.5, la primera es en función del propósito del tratamiento, y la segunda de acuerdo con el tratamiento empleado. Tal cual se observa la en la tabla 1.5, las superficies de los implantes pueden ser modificados mediante métodos mecánicos (desbaste, pulido con diferentes tamaños de abrasivos, mecanizado) métodos químicos (ataque ácido, procesos electroquímicos) y métodos físicos (recubrimientos por plasma spray) o por combinación de ellos [44], [45].

Tabla 1. 5. Propiedades que caracterizan la superficie de un implante

PROPIEDAD	TIPO DE INFORMACIÓN
Composición química	Composición atómica
	Estado químico de los elementos
Estructura	Cristalinidad
Orden	Inclusiones
Desorden	Vacantes
	Limites de grano
Morfología	Forma 2D y 3D de los detalles superficiales
Textura	Área específica
Rugosidad	Porosidad
Forma	
Energía superficial	Mojabilidad
	Adsorción
	Energía superficial
Eléctrica	Potencial de superficie
	Cargas superficiales
Mecánica	Elasticidad/ Plasticidad
	Tensiones residuales

Fuente: [43]

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* indicaron que existe una correlación entre la rugosidad superficial, la adhesión celular y la actividad osteoblástica, así también como con otros factores que influyen en la osteointegración; como ser la adhesión de proteínas, síntesis de colágeno y maduración de condrocitos; siendo un resultado general que la rugosidad micrométrica influye positivamente en una retención mecánica luego de la implantación [46]–[48].

Por otro lado, los efectos de una superficie en la nano-escala son muy ventajosos y también han demostrado promover la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como la integración del tejido [49]–[51]. Entre estos métodos podemos mencionar los siguiente:

- Métodos mecánicos: Se usan principalmente para obtener una superficie rugosa o lisa siendo el objetivo principal la obtención de diferentes topografías que aumentan el área superficial favoreciendo la biomineralización [52]. Involucran fuerzas externas capaces de maquinar, pulir o arenar la superficie. El arenado o desbaste mecánico consiste en el impacto de un chorro de partículas usando aire comprimido contra la superficie del implante.
- Métodos químicos: Estos métodos proveen a la superficie del titanio de propiedades bioactivas. Su principal objetivo es mejorar la biocompatibilidad, bioactividad y conductividad hacia el hueso, resistencia a la corrosión y remoción de contaminantes. Entre los más usados están el ataque ácido y alcalino, la anodización electroquímica y recubrimientos bioquímicos [45], [53]. La deposición sol-gel es ampliamente usada para la deposición de recubrimientos cerámicos permitiendo un mejor control en la composición y microestructura, formación de capas homogéneas y la utilización de equipos simples y de bajo costo. El método de deposición química por vapor (CVD) consiste en reacciones químicas entre los químicos en fase gaseosa y la superficie del sustrato permitiendo la deposición de compuestos no volátiles en la superficie del implante. El método electroquímico consiste en conectar el polo positivo de un circuito eléctrico al sustrato metálico y sumergir el sistema en una solución

electrolítica que contenga iones u oxidantes. Los métodos bioquímicos permiten la unión o adición de biomoléculas específicas en la superficie del implante.

- Métodos físicos: Estos métodos incluyen procesos como deposición física por vapor, pulverización catódica, aerosol térmico o de llama, entre otros; en donde la capa modificada o el recubrimiento del sustrato es producto de la energía térmica, cinética o eléctrica involucrada. Como por ejemplo en los tratamientos de aerosol térmico donde el recubrimiento se obtiene luego de un tratamiento térmico que derrite en forma de gotas el material que recubrirá el implante el cual es eyectado luego a alta velocidad en forma de aerosol para impactar con el implante.

Tabla 1. 6. Clasificación más comunes de las modificaciones superficiales

Según el objetivo	<p>Limpieza de la superficie y/o la eliminación de la capa superficial nativa</p> <p>Modificación de la estructura y la topografía (lisa, rugosa, porosa)</p> <p>La modificación de la composición y la estructura de la capa de óxido o la formación controlada de un nuevo recubrimiento en la superficie, en la mayoría de los casos, cambiando el carácter bioinerte del titanio por un material bioactivo</p>			
		Tipo	Capa	Objetivo
Según el método empleado	Mecánicos	desbaste, pulido, mecanizado y granallado [54]	Superficie rugosa o lisa formada por a partir de los procesos de sustracción	Producir topografías específicas; limpiar la superficie; mejorar la adhesión y la unión con el tejido biológico
	Químicos	Tratamiento químico:	Capa superficial de óxido <10 nm	Remover capas de óxido y contaminación
		Ataque ácido [55]	~1 µm de gel de titanato de sodio	Mejorar la biocompatibilidad, bioactividad o conductividad hacia el hueso
		Ataque alcalino [56]	~5 nm de una capa de óxido porosa	Mejorar la biocompatibilidad, bioactividad o conductividad hacia el hueso
		Tratamiento de peróxido de hidrógeno [57]		
		Sol-gel [58]	~10 µm de una capa de fosfato de calcio, TiO ₂ o SILICA	Mejorar la biocompatibilidad, bioactividad o conductividad hacia el hueso
		CVD [57]	~1µm de una capa de TiN, TiC, TiCN o de carbono tipo diamante	Mejorar la resistencia al desgaste, resistencia a la corrosión y la compatibilidad con la sangre

		Oxidación anódica [59]–[61]	~10 µm a 40 µm de una capa de TiO ₂ , adsorción o incorporación de aniones del electrolito	Producir topografías específicas; mejorar la resistencia a la corrosión; mejorar la biocompatibilidad, bioactividad o conductividad
		Métodos bioquímicos [62], [63]	Adsorción, fotoquímica, capas monoensambladas, etc.	Inducir una respuesta específica del tejido o células por medio de la inmovilización superficial de péptidos, proteínas o factores de crecimiento
		Métodos de recubrimiento - (proyección por plasma, sol-gel)[64], [65]	Capas de diferentes materiales con espesores de ~1 µm	Cambiar la composición química de la superficie de un material por medio de un recubrimiento
	Físicos	Spray térmico [66] Aerosol de llama, Plasma aerosol	Recubrimientos de Ti, HA, Al ₂ O ₃ , ZrO ₂ , TiO ₂ con un espesor de ~30 a 200 µm	Mejorar la resistencia al desgaste y a la corrosión y las propiedades biológicas
		Evaporación [67], Haz de iones [68] Pulverización catódica [69]	Capas de TiN, TiC, TiCN, de carbono tipo diamante y de HA (por pulverización catódica) con espesores de ~1 µm	Mejorar la resistencia al desgaste y a la corrosión y la compatibilidad con la sangre
		Implantación y deposición de iones [70]	Superficies modificadas de ~10 nm o capas delgadas en el orden de los µm	Modificar la composición superficial, mejorar la resistencia al desgaste y a la corrosión y la biocompatibilidad
		Plasma de descarga luminosa [71]	Superficie modificada de espesores entre ~1 nm a ~100 nm	Limpiar, esterilizar u oxidar la superficie, remoción de la capa nativa de óxido

Se define topografía como la morfología o configuración de una superficie, siendo las propiedades topográficas básicas la rugosidad y la textura. Esta última, da cuenta de una amplia serie de configuraciones que se disponen deliberadamente sobre la superficie. Entre dichas configuraciones se encuentran los surcos, los cantos, las crestas, las colinas, los poros y los valles, entre otros, dispuestos de forma regular y con determinadas dimensiones y distribuciones previamente definidas. Por otra parte, la rugosidad da cuenta de las irregularidades y asperezas que puede superponerse a la forma de una determinada pieza. La topografía de la superficie de los implantes es fundamental para la adhesión y la diferenciación de los osteoblastos durante la fase inicial de la osteointegración, como así también a largo plazo en la remodelación ósea [44], [72].

La rugosidad superficial implantaria [43] puede ser categorizada en macro, micro y nanorugosidad, cada una con ventajas respecto al comportamiento del implante y a la formación de la interfase hueso-implante. Dichos niveles pueden ser observados en la figura 1.5 y son detallados a continuación:

- La macrorugosidad se compone de patrones en el rango del milímetro a décimas de micrones. Esta escala se relaciona directamente con la geometría del implante, la rosca del tornillo y los tratamientos de superficie macroporosa. La fijación primaria del implante y su estabilidad mecánica a largo plazo pueden ser potenciadas con una apropiada macrorugosidad.
- La microrugosidad es definida en el rango de 1–10 μm . En la actualidad, la mayoría de los implantes dentales que se comercializan en el mercado tienen una rugosidad media (Ra) de 0,3 - 3 micras. Según [73]–[75], este intervalo parece proporcionar un grado óptimo de rugosidad para promover la osteointegración. Las técnicas de modificación superficial de los implantes a nivel micro están bien documentadas y han sido rutina clínica durante décadas, entre ellas podemos mencionar al chorreado (Grit-Blasted), grabado o ataque ácido (Acid-Etched), arenado (Sandblasted), entre otras.
- La nanorugosidad, su uso es de aparición reciente e involucra materiales con un rango dimensional entre 1 y 100 nm. Si bien se ha propuesto que la microrugosidad de la superficie del implante actúa a nivel celular en la osteointegración, se cree que la nanorugosidad de los implantes dentales puede influir en las interacciones célula-implante a nivel celular y de proteínas, [76], [77]. Las superficies a nivel nanométrico presentan un incremento en la energía superficial y con ello la mojabilidad a la sangre y la adhesión celular osteogénica, y facilitaría el depósito de fibrina, factores de crecimiento y matriz proteica favoreciendo la osteointegración [77]–[79]. Las modificaciones en tamaño nanométrico se pueden clasificar en dos grupos, a saber, nano-recubrimiento o deposición de películas, que consiste en un recubrimiento con características nanométricas sobre un sustrato; y nano-funcionalización “in situ”, la cual consiste en la modificación directa de la superficie del sustrato. Estos dos tipos de técnicas a menudo se combinan para producir superficies con nanoestructuras híbridas tales como un recubrimiento/película sobre una zona nanoestructurada [77]. Técnicas típicas de recubrimientos y deposición de película son la pulverización por plasma, implantación iónica por inmersión en plasma y deposición, sol-gel, deposición, CVD, deposición física en fase vapor, pulverización en frío, deposición electroquímica, entre otras. Mientras que las técnicas de nano modificación superficial “in situ” incluyen grabado por láser (laser etching), granallado (shot blasting), tratamientos ácidos y alcalinos, oxidación anódica, oxidación micro-arco, entre otras.

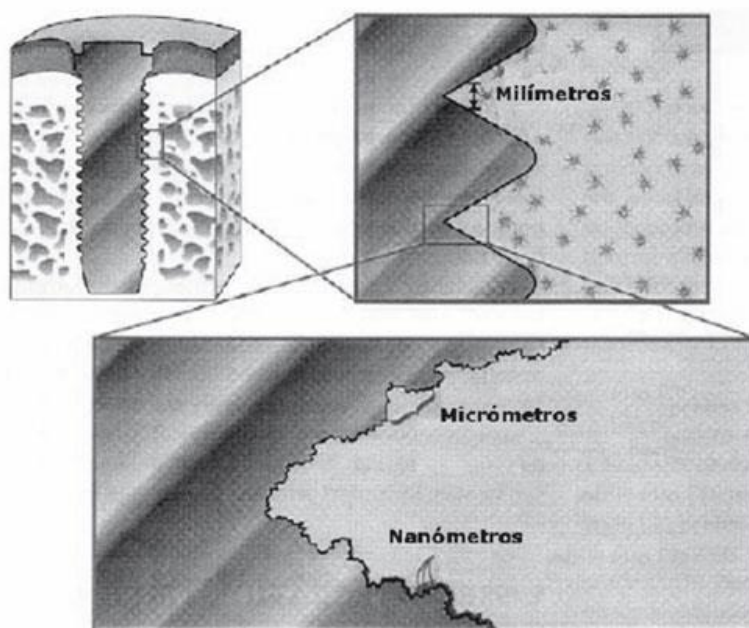


Figura 1. 5. Escalas de modificaciones superficiales de un implante dental endoóseo. Desde arriba hacia abajo: milímetros, micrómetros y nanómetros. Adaptada de [80]

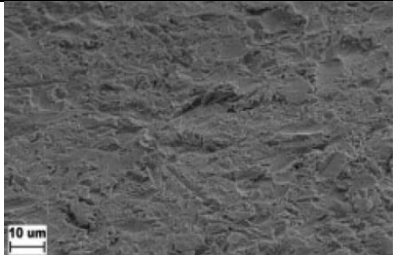
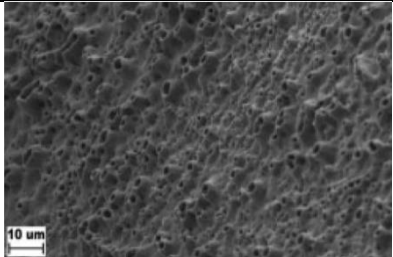
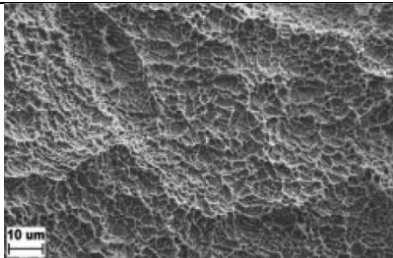
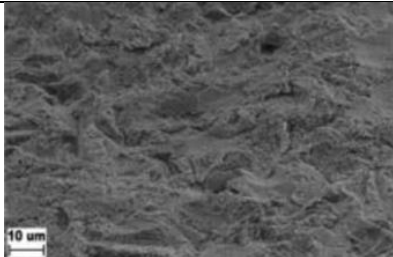
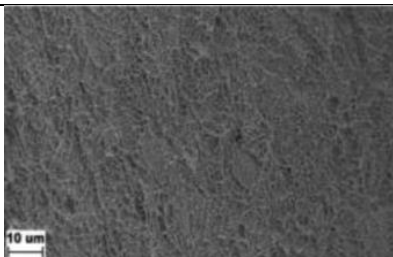
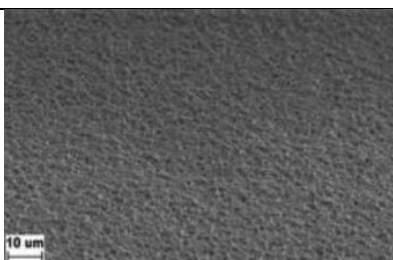
En el mercado actualmente

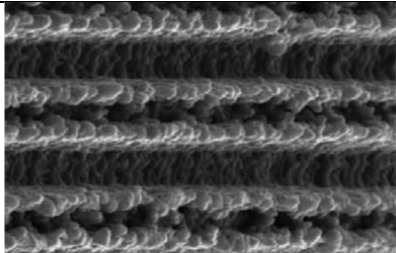
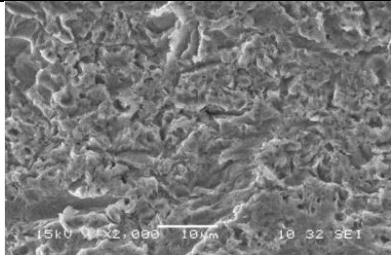
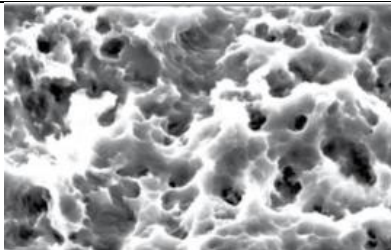
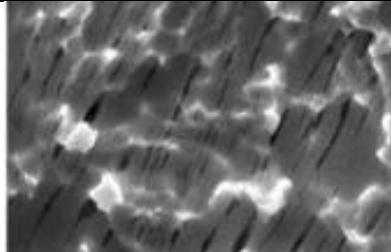
La industria mundial de los biomateriales y dispositivos médicos está, principalmente, en poder de los países altamente desarrollados, a través de grandes empresas multinacionales que dominan tanto la esfera investigativa, como la producción y la distribución. Varios son los factores que conllevan al dominio del mercado por grandes empresas con capitales multimillonarios, capaces de afrontar los costos previos a la comercialización, como son:

- El cliente es altamente especializado, ya que se trata de profesionales de las distintas especialidades médicas o instituciones públicas o privadas de atención médica. Esto implica grandes costos de mercadeo.
- Las agencias reguladoras imponen rigurosos y costosos protocolos de validación preclínica y clínica antes de otorgar su licencia para la comercialización.
- Los costos de desarrollo y validación son muy elevados, y requieren de equipos multi e interdisciplinarios de profesionales altamente calificados, además de instalaciones y equipamientos de alto costo.

A continuación, se muestra en la tabla 1.6 un resumen de los principales fabricantes y modelos de implantes médicos que se comercializan normalmente en Argentina, siendo algunos de fabricación nacional. Las imágenes mostradas en la tabla corresponden a una microfotografía SEM de las superficies, pero son puramente ilustrativas considerando que no se encontraron las magnificaciones o escalas correspondientes para todos los casos.

Tabla 1. 7. Implantes dentales de uso común en Argentina

Modelo o tipo de superficie/ EMPRESA	Modificación	Origen	Imagen ilustrativa
TiOblast®/ASTRA TECH AB [81]	Superficie arenada con partículas de TiO ₂	Sweden	
TiUnite™ / NOBEL BIOCARE [81]	Oxidación anódica	Sweden	
SLA® / INSITUTE STRAUMANN [81]	Arenado con grano grande y grabado ácido	Switzerland	
OsseoSpeed® / ASTRA TECH AB [81]	Superficie con elevados niveles de hidrógeno y trazas de iones flúor por medio de un grabado ácido en HF	Sweden	
OSSEOTITE® / ZIMMER BIOMET [81]	Doble grabado ácido	Polonia España(*)	
NanoTite™ / ZIMMER BIOMET [81]	OSSEOTITE® + partículas de fosfatos cálcico depositadas por Deposición Discreta Cristalina (DCD™)	Polonia España(*)	

Laser-Lock® / <i>BIOHORIZONS</i> [82]	Maquinado con láser para lograr micro y nano- canales	EEUU	
Zimmer MTX™ / <i>ZIMMER BIOMET</i> [82]	Arenado y partículas de HA	Polonia España (*)	
She / ML® <i>IMPLANT SYSTEM</i> [83]	Arenado y grabado ácido	Argentina	
UnicCa® / <i>BTI</i> [84]	Grabado ácido más modificación superficial con iones calcio	España	
Hex / <i>ROSTERDENT</i>	Arenado y grabado ácido	Argentina	-Sin imagen-
Reactive 3.0 / <i>ODONTIT</i>	Superficie rugosa por doble grabado ácido y arenado	Argentina	-Sin imagen-

(*) origen de ambas compañías, Zimmer (Polonia), Biomet (España)

Entre las técnicas más comunes que se utilizan en el mercado para la modificación de la superficie encontramos el arenado y grabado ácido. Las mismas modifican la topografía a nivel de rugosidad microscópica y nanoscópica, como así también químicamente [85]. Una de las modificaciones de superficies más reconocidas es la SLA® patentada por la empresa Straumann la cual consiste en un arenado con grano grande (0.25–0.5 mm) seguido de un grabado ácido en una solución de HCl/H₂SO₄. Posteriormente, la empresa presentó una mejora donde incorpora una modificación química a la superficie previamente descrita y la denominaron SLActive®. La misma consiste en la implementación del mismo protocolo que para SLA® pero su preparación ocurre en un ambiente controlado con N₂ y su almacenamiento es en una solución isotónica de NaCl, evitando así la contaminación de la superficie con hidrocarburos. Los implantes Zimmer MTX™ ofrecen una superficie micro-texturizada que consiste en un

arenado utilizando un medio soluble y biocompatible seguido de una limpieza en un baño ácido para eliminar cualquier residuo de polvo micro-impactado. Asimismo, Zimmer BIOMET también presenta su versión de implantes recubiertos de hidroxiapatita altamente cristalina la cual es lograda por medio de un método hidrotérmico de alta presión denominado MP-1 HA. BTI es una marca española que fabrica desde sus inicios implantes con dos tipos de conexiones, interna y externa. Recientemente se ha abocado al estudio de la modificación superficial de los mismos. Es así que encontramos dos tipos de tratamientos: 1) superficie Óptima® que se obtiene mediante un tratamiento de grabado ácido y 2) superficie UnicCa® que resulta del complemento de la superficie Optima® más la incorporación de iones Ca en la superficie. La liberación de los dichos iones calcio provoca la coagulación inmediata de la superficie del implante, así como la adhesión y activación plaquetaria y la liberación de factores de crecimiento. Por otro lado, haciendo uso de un tratamiento de ablación laser aparece la tecnología Laser Lock de Biohorizons por medio de la cual se realizan microcanales en la superficie de los implantes usando un láser lo cual resulta en un patrón de panal de abeja con pequeños poros.

Entre las marcas argentinas encontramos la empresa Odontit, qué, en conjunto con el INTI y la CNEA, desarrolló implantes de piezas dentales con conexión hexágono interno tal cual se comercializan mundialmente. Hasta ese momento solo pocos implantes con dichas características se comercializaban en el país y eran de origen extranjero y por lo tanto muy costosos. Con esta nueva línea de implantes nacionales ellos solo introdujeron un tipo de modificación superficial basada en un doble grabado ácido y arenado, el cual implementan en la mayoría de sus productos (modelos: Reactive 3.0, Ball, Monoblock, Hex Implant, Efedea y Smartgrip). La empresa Miguel Libertini S.A. conocida como ML® Implant System, también de origen argentino, implementa asimismo un solo tratamiento superficial para todos sus productos, el cual consiste en tres etapas, primero un arenado, luego un grabado ácido y finalmente un pasivado; este último, mediante la aplicación de un tratamiento ácido, permite aumentar el espesor de la película de óxido. De esta manera la superficie final de los implantes posee una mayor área de contacto gracias a la porosidad lograda. Por otro lado, la marca argentina RosterDent presenta también un único tratamiento superficial para todos sus productos que consiste en un arenado seguido con un tratamiento ácido, combinación conocida como SLA.

La mayoría de los implantes disponibles en el mercado actualmente presentan una rugosidad moderada en dimensiones micrométricas que oscilan entre 0,3 μm y 3 μm , modelos como TiOBlast®, TiUnite™ y SLA® han demostrado éxito clínico por más de 10 años [74], [75] Los datos indican que las rugosidades superficiales de los implantes han permanecido como tales por muchos años pero ahora el diseño de los implantes ha tomado un nuevo rumbo enfocándose en la modificación de la topografía y la química superficial del mismo [86].

Además, teniendo en cuenta las empresas que comercializan implantes en Argentina, podemos mencionar que se encuentran principalmente enfocadas en la fabricación de implantes de Ti de diferentes diámetros, longitudes y diseños, como también en elementos protésicos para ser acoplados a los mismos o elementos auxiliares que serán usados en procedimientos quirúrgicos. De lo cual se extiende que sus líneas de investigación no están orientadas principalmente a los tratamientos superficiales que podrían mejorar significativamente la osteointegración de los dispositivos.

A pesar del respetable éxito de la mayoría de los sistemas de implantes, recientemente se reportó sobre la resorción ósea a largo plazo y la aparición de infecciones en los implantes actuales que llevan a una peri-implantitis [87], [88]. Además, condiciones como poca higiene bucal, pacientes fumadores o con ciertas enfermedades como diabetes, ponen en la mira el uso de dichos implantes [87], [89]. La búsqueda ahora no es diseñar un nuevo implante dental si no refinar las características superficiales de los existentes de manera de seguir aprovechando las ventajas macroscópicas (forma de tornillo) y microscópicas (rugosidad) que presentan y que han demostrado éxito clínico a lo largo de los años [90]–[92]. Por esto, la presente tesis estudia la modificación superficial de los implantes de Ti y su posible efecto.

Aspectos generales del método de anodizado

El anodizado consiste en el crecimiento, mediante un proceso electroquímico, de películas de óxido de espesor controlado y con mejores propiedades protectoras que los óxidos formados de manera natural sobre el metal. Constituye un método de bajo costo y fácil implementación para la fabricación de nanoestructuras tubulares de TiO_2 alineadas y orientadas verticalmente sobre una superficie metálica [93]–[95]. Entre los componentes típicos necesarios para generar nanotubos en la superficie de sustratos metálicos a través de la anodización podemos mencionar: una fuente de alimentación, un sustrato metálico que actúa como el electrodo de trabajo (o ánodo) en donde se desea hacer crecer la capa de óxido, un contraelectrodo que sirve como cátodo y un electrolito en el que los electrodos son sumergido y se usa para completar el circuito [96]. Todos estos componentes tienen efectos sobre las reacciones químicas que ocurren al cerrar el circuito y a la vez dictan las propiedades de la capa nanotubular resultante [94], [95], [97]. A pesar de que la síntesis de láminas nanotubulares sobre diferentes superficies metálicas ya ha sido demostrada, aún continúan los estudios para implementar dichas estructuras en aplicaciones biomédicas. Por lo que en esta tesis se optó por la utilización del método de anodizado para la fabricación de nanotubos de TiO_2 con miras a futuras aplicaciones en implantes médicos metálicos.

Aplicaciones biomédicas de los nanotubos de TiO_2

Investigaciones recientes [98], [99] demostraron que la interacción entre el material y el tejido corporal se rige principalmente por modificaciones nanométricas de la superficie del implante. Las mismas pueden ser en la forma de nanogranos, nanoporos, nanotubos, nanopartículas, nanocables y nanovarillas, y han sido sintetizadas utilizando diferentes técnicas [77]. Además, estudios de la respuesta celular han sugerido que las superficies con nanoestructuras de TiO_2 tienen un efecto positivo en el comportamiento celular.

Ciertas propiedades de los arreglos nanotubulares como ser su naturaleza semiconductora, su geometría y la química de su superficie pueden aportar numerosas ventajas en diferentes aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, estudios *in vitro* han demostrado que sirven para controlar la actividad celular, mejorar la actividad antibacteriana, proveer de una mineralización inducida por superficie, como dispositivos para liberación controlada de drogas, como sensores, entre otros [100]. Mientras que en *in vivo* han sido usados para mejorar la osteointegración, biocompatibilidad y síntesis de proteínas [101].

Los NT de TiO_2 fabricados por método anódico, presentan una buena adherencia, tal como lo sugiere Crawford puesto que crecen directamente sobre la superficie de Ti de manera que se crea una unión directa química entre la nanoestructura y el sustrato [102]. El mismo autor menciona que la principal ventaja de los NT de TiO_2 son sus propiedades mecánicas, de gran parecido con las del hueso [103], [104]. Desde el punto de vista biológico, es conveniente

señalar que la ventaja clave de la utilización de los NT de TiO_2 en las interacciones de células se basa en el hecho de que la morfología de los NT de TiO_2 se correlaciona con la adhesión celular, propagación, crecimiento y diferenciación de células madre mesenquimales. Se ha indicado [105] que la presencia de nanotubos en la superficie del titanio aumenta la formación de apatita y que la capa de nanotubos con espesores en el orden de los micrómetros desencadena la deposición más rápido que las capas más delgadas. Además, los tubos con fase cristalina anatasa, o una mezcla de anatasa y rutilo son claramente más eficaces en la promoción de la formación de apatita que los tubos en estado amorfo.

Teniendo en cuenta esta respuesta celular, es posible encontrar una gran variedad de aplicaciones biomédicas para los nanotubos de TiO_2 como ser: (a) implantes ortopédicos y dentales [101], [106] considerando que presentaron una mejor adhesión al hueso en comparación con superficies arenadas [107]; (b) stents de vejiga, considerando que un recubrimiento de nanotubos de TiO_2 en los stents promueve la adhesión y proliferación de las células del tejido urotelial [108] y (c) en aplicaciones donde el biomaterial estará en contacto con sangre, considerando que la presencia de nanotubos en la superficie del dispositivo medico disminuye los efectos trombogenicos [109].

2. Fabricación y caracterización de los nanotubos de titania

En este capítulo se describirá el protocolo empleado para la síntesis de la capa de nanotubos (NT) de TiO_2 en los sustratos de Ti. En una primera etapa se resumen los antecedentes bibliográficos y se detalla el proceso de formación y crecimiento de los NT de TiO_2 mediante anodizado electroquímico en un electrolito con iones F^- . Luego se plantean los materiales, equipamientos y pasos necesarios para la obtención de NT de TiO_2 por anodizado electroquímico, limpieza, tratamiento térmico, generación de microcanales en la superficie del Ti, y caracterización de estos. Finalmente se estudiará también el efecto de la variación de diferentes parámetros en la formación y morfología de los NT.

Abreviaciones

ANSI	American National Standard Institute
ASTM:	American Society for Testing and Materials
CE	contraelectrodo
FEPA:	Federation of European Producers of Abrasives
JIS:	Japanese International Standard
M:	metal
NT de TiO_2 :	nanotubos de óxido de titanio
Ra	rugosidad media
Rz	rugosidad de profundidad media
s	segundos
Ti c.p.	titanio comercialmente puro
V	voltaje aplicado
WE	electrodo de trabajo

2.1. Introducción

El TiO_2 es uno de los compuestos más estudiados en las ciencias de los materiales debido a su estabilidad química la cual lo posiciona como un buen candidato para aplicaciones de fotocatalisis, celdas solares sensibilizadas por colorante, y dispositivos biomédicos, entre otros. La síntesis de nanoestructuras de TiO_2 unidimensionales de forma tubular ha sido objeto de investigación durante los últimos años en donde se han reportado diferentes métodos para su fabricación; entre los cuales se encuentran principalmente el método de plantilla asistida [110], tratamiento hidrotérmico [111], deposición por baño químico [112], oxidación anódica electroquímica [113], sol-gel [114], método de sembrado y crecimiento [115] o combinaciones de ellos [116]. Entre estos los más comúnmente usados son el método hidrotérmico y el

anodizado electroquímico, destacándose este último por su simplicidad y bajo costo de implementación.

Mecanismo de formación y crecimiento de NT de TiO_2 mediante anodizado electroquímico

El Ti y sus aleaciones pueden ser anodizados en soluciones ácidas o básicas bajo condiciones potencioestáticas. La anodización electroquímica generalmente es el método más útil para modificar la estructura superficial de algunos metales entre ellos Ti, Al, C, Sn, Zn permitiendo la formación de estructuras nanoporosas o nanotubulares altamente orientadas.

El anodizado consiste en el crecimiento mediante un proceso electroquímico de películas de óxido de espesor controlado y con mejores propiedades protectoras que los óxidos formados de manera natural sobre el metal. Emplea una celda electroquímica de dos electrodos donde el ánodo es el material en el cual se desea crecer la capa de óxido y el cátodo es una placa o varilla de un material químicamente inerte en el baño de anodizado (electrolito). Se utiliza un circuito eléctrico externo para conectar los electrodos y establecer una diferencia de potencial entre ellos tal como se muestra en la figura 2.1. Los materiales más empleados como cátodos son el grafito, el acero inoxidable y el platino. El crecimiento de capas porosas de TiO_2 crecidas por anodizado puede realizarse en una variedad de electrolitos, donde una característica común es la presencia de iones haluros, siendo los iones flúor (F^-) los más comunes. Se ha reportado que la geometría de las capas anódicas puede modificarse en función de los diferentes parámetros del proceso de anodizado, siendo la intensidad del campo eléctrico un factor esencial en la determinación de las características de los NT (longitud, diámetro y espesor de la pared) [117], [118]. En relación con el potencial y al tiempo de anodizado la mayoría de los estudios aplican voltajes altos, entre 20 y 100 V y tiempos de anodizado de varias horas [119]–[122]. En general, a altos potenciales (> 20 V), el diámetro y la longitud del tubo tienen una relación lineal con el potencial [119], [123], y el diámetro promedio del poro es de 140 nm con espaciamiento entre ellos de 150 nm [122].

En contraste con el abundante estudio alrededor de nanoestructuras auto-organizadas elaboradas a potenciales mayores de 20 V que encarecen su fabricación, poco se ha reportado de las características de las nanoestructuras elaboradas a bajo potencial. El presente capítulo investiga la formación y fabricación sistemática de capas nanotubulares usando la técnica de anodización electroquímica a bajos potenciales con equipos accesibles en cualquier laboratorio electroquímico.

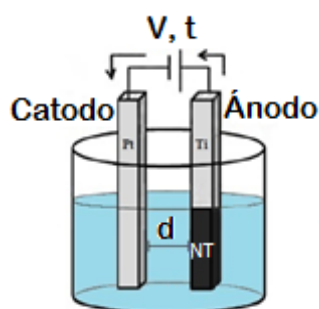
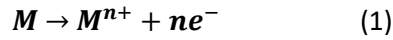


Figura 2. 1. Esquema de una celda electroquímica de dos electrodos empleada en los procesos de anodizado.

- Crecimiento de la capa anódica

Cuando los metales (M) están expuestos a una tensión anódica suficiente en una configuración electroquímica, se inicia una reacción de oxidación, como se muestra en la ecuación (1):



La cual depende de los diferentes parámetros del proceso de anodizado como ser: la naturaleza del electrolito empleado (orgánico o acuoso) y su composición, el pH, la temperatura del baño, el tiempo de tratamiento, el voltaje aplicado, etc. existen esencialmente tres posibilidades de reacción:

- Los iones M^{n+} se disuelven en el electrolito, es decir, el metal se disuelve de forma continua y se puede observar la corrosión o electropulido del metal figura 2.2 (a).
- Los iones de M^{n+} formados reaccionan con O^{2-} , proporcionados por las moléculas de H_2O del electrolito y forman un óxido compacto o capa barrera, figura 2.2. (b), que no es soluble en el electrolito.
- Se establece la competencia entre la formación del óxido y la disolución que conduce a una capa dúplex, formada por una capa porosa/tubular en la parte externa de la película y una capa barrera generada en la intercara óxido/metal (capa libre de poros). Se denominan capas nanoporosas o nanotubulares, figura 2.2. (c), dependiendo de si se han formado o no espacios intertubulares entre los poros [29].

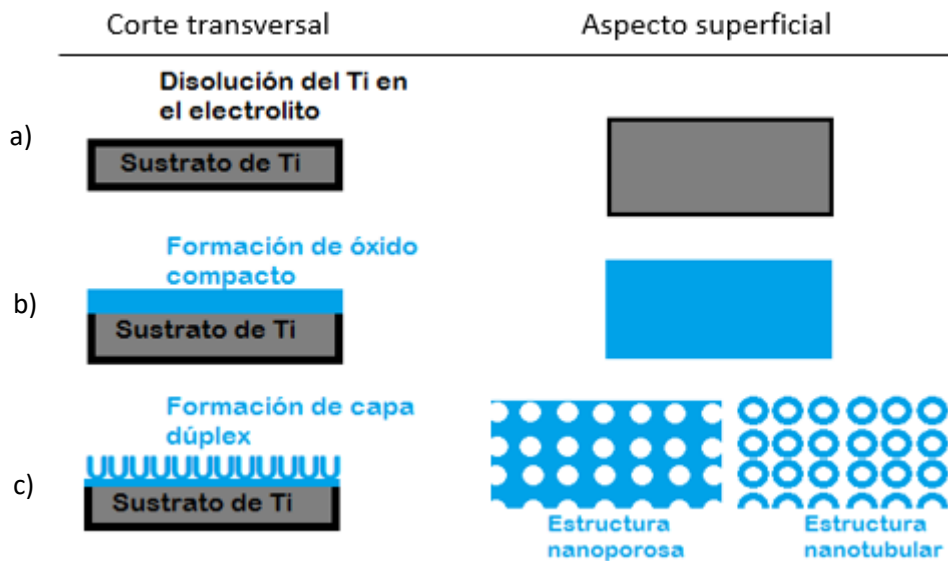
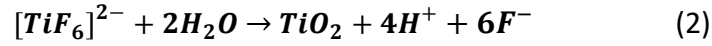


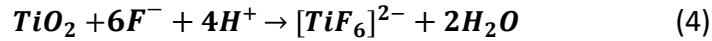
Figura 2. 2. Esquema del tipo de morfologías obtenidas mediante anodizado: a) Iones del metal que se disuelven en el electrolito, b) formación de capa barrera de óxido compacto y c) formación de capa dúplex nanoporosa o nanotubular.

Existe un modelo clásico para la formación y crecimiento de NT de TiO_2 en electrolitos con iones F^{-} que describe una interacción entre tres procesos que suceden simultáneamente: (i) oxidación del Ti, asistida por campo eléctrico, para formar TiO_2 ; (ii) disolución asistida por campo eléctrico de iones de Ti metálicos en el electrolito y (iii) disolución de Ti y TiO_2 debido al ataque químico por el ion F^{-} , que se incrementa sustancialmente por la presencia de iones H^{+} [113], [124].

Dicho modelo explica el crecimiento de las nanoestructuras con la evolución de la curva de densidad de corriente en función del tiempo de anodizado, al fijar un valor de voltaje constante, ver figura 2.3. Asume la formación inicial de una capa barrera de TiO_2 sobre la superficie del titanio asistida por el campo eléctrico mediante la ecuación (2).



Luego los iones F^- contenidos en el electrolito se combinan con Ti^{4+} a través de la ecuación (3) y disuelven el TiO_2 , ecuación (4).



Las picaduras o huecos en la capa de óxido proporcionan ubicaciones preferenciales para la disolución química del TiO_2 asistida por campo, a través de las ecuaciones (3) y (4) inducida por los iones fluoruro [121], [125]. Los nanotubos se forman conforme dichos huecos continúan disolviéndose químicamente ya que los mismos proporcionan la ruta menos resistente para la corriente, por lo tanto, la alta velocidad de disolución forma el interior de los tubos de los pozos.

A medida que el voltaje aumenta a su magnitud establecida, la corriente en la figura 2.3, también aumenta (Región I) mientras que comienza la formación de la capa barrera de TiO_2 sobre la superficie del sustrato que proporciona suficiente resistencia para lograr una disminución abrupta de la corriente (Región II). Posteriormente, la corriente aumenta nuevamente a medida que la Ecuación (3) comienza a aumentar el área de superficie al aumentar la cantidad de defectos superficiales (pits) provocados por la disolución localizada dando lugar a la formación de poros a la vez que adelgaza la capa de óxido.

Estos poros crecen fundamentalmente por efecto de la disolución asistida por el campo eléctrico y por la acidificación local debida a la oxidación e hidrólisis del titanio (disolución química) en el fondo del poro, generando un gradiente de pH entre el fondo y la boca de estos. A medida que éstos se vuelven más grandes, la disolución preferencial en la base del poro, por efecto del campo eléctrico, es más fuerte y ejerce el control sobre el crecimiento de la capa anódica, en comparación con su efecto sobre la pared del poro/tubo donde la disolución química tiene mayor influencia. Finalmente, la corriente alcanza un valor constante, Región III, momento a partir del cual se alcanza un estado de equilibrio entre la formación del óxido en la intercara metal/óxido y la velocidad de disolución química en la interfase óxido/electrolito, lo que representa un estado estable entre las ecuaciones (2) - (4) mencionadas anteriormente [113], [126].

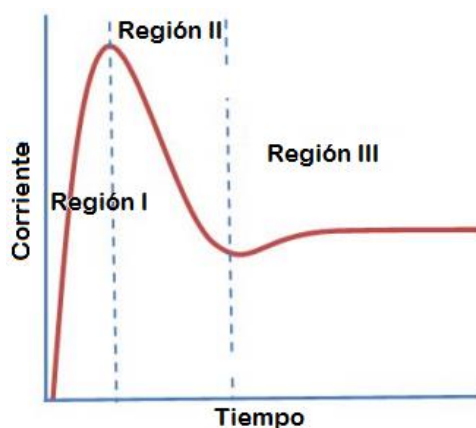


Figura 2. 3. Esquema del perfil de corriente durante la formación de NT de TiO_2 . Región I: La corriente incrementa a medida que se estabiliza el V en la celda electroquímica, Región II: se forma una capa barrera de TiO_2 compacto y Región III: la formación y disolución de TiO_2 alcanzan un estado estacionario mientras se produce la formación de NT. Figura adaptada de [127].

En este sentido, es importante destacar que la principal diferencia entre las capas barrera y las capas nanoporosas/nanotubulares reside en que mientras el crecimiento de las capas barrera ocurre tanto en la intercara metal/óxido como en la interfase óxido/electrolito, en el caso de las capas nanotubulares el crecimiento sucede exclusivamente en la intercara metal/óxido. Por otro lado, la morfología de las capas nanoestructuradas depende en gran medida del proceso de disolución química que, en medios acuosos con fluoruros, es muy elevado y en algunas ocasiones, es el proceso principal que gobierna en la región III (crecimiento de los tubos).

Así, el crecimiento consiste en un proceso competitivo entre la formación de la capa anódica y su disolución tanto por efecto del campo eléctrico que debilita las uniones entre el titanio y el oxígeno (disolución asistida por el campo) como por la presencia de iones fluoruro en el medio de anodizado (disolución química). Cuando se llega a este punto, la longitud de los nanotubos es independiente de la duración del anodizado y dependerá de la concentración del electrolito y la tensión aplicada, principalmente. Es decir, los nanotubos no se pueden formar si la disolución química es muy rápida o muy lenta en comparación con la formación de la película de óxido.

Factores y parámetros del proceso de anodizado que influyen en la morfología de NT de TiO_2

A continuación, se explican de qué manera afectan cada uno de los parámetros del proceso de anodizado en la morfología de la capa nanotubular de TiO_2 . En la figura 2.4, se presenta de manera esquemática las variables que inciden en la longitud, diámetro y acabado superficial de la capa nanotubular.

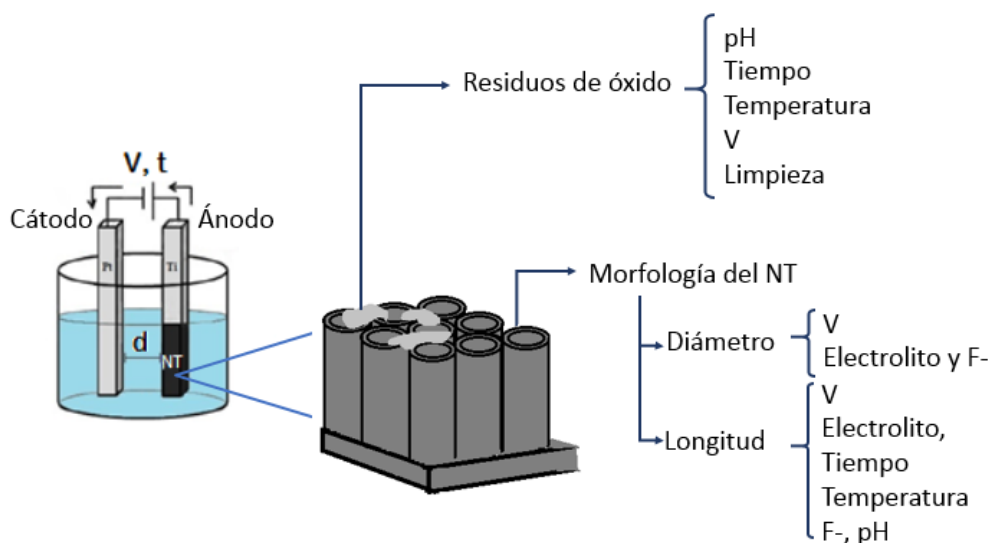


Figura 2. 4. Esquema de la influencia de los parámetros de anodizado en la morfología de estructuras nanotubulares de TiO_2 .

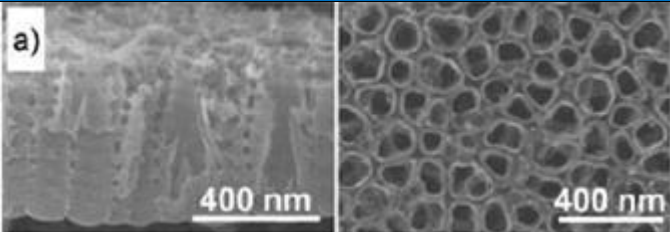
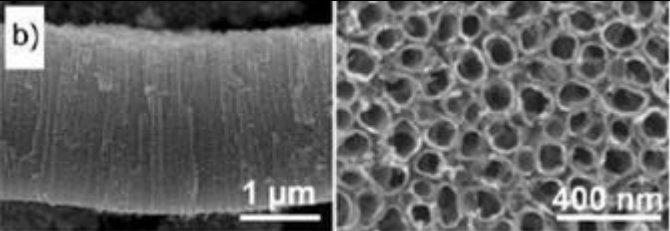
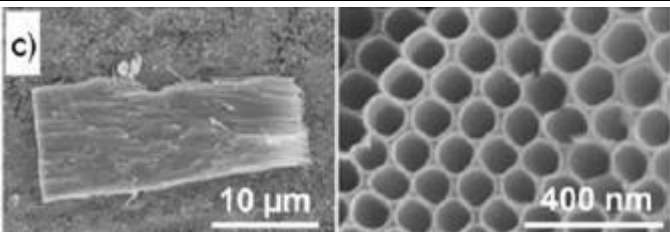
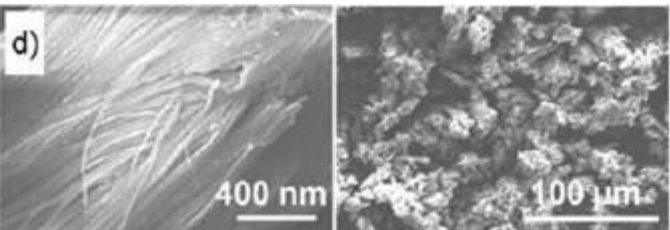
- Composición de la solución de trabajo

Existen muchos trabajos publicados en la bibliografía en los que se señala que el pH, la concentración de fluoruros, el contenido de agua (en el caso de baños orgánicos) y la temperatura del electrolito afectan directamente a las características morfológicas de los nanotubos generados. En este sentido, [128] propusieron una clasificación de capas nanotubulares crecidas en titanio y sus aleaciones en cuatro generaciones según el electrolito empleado para fabricarlas. En la tabla 2.1 se presentan las principales características de cada una de ellas junto a una microfotografía para una mejor ilustración.

- Contenido de Agua

Las paredes de los tubos formados en electrolitos que contienen 1% de agua o menos resultan lisas en toda su longitud. Mientras que con el incremento de esta se producen finas ondulaciones o nervaduras que se tornan más gruesas conforme aumenta el contenido de la misma [129].

Tabla 2. 1. Clasificación de capas nanotubulares según el tipo de electrolito usado en el proceso de anodizado

Clasificación	Tipo de electrolito	Características de la capa	Micrografía SEM de la capa nanotubular Sección transversal/ Vista superior	Ref
1ª Generación	Solución acuosa ácidas con HF	-La anodización se produce con tensiones bajas (~ 3 a ~ 20 [V]) a temperatura ambiente -Debido a la elevada disolución química causada por la acidez del electrolito, las estructuras alcanzan espesores entre 100-500 [nm]		[128], [130]– [132]
2ª Generación	Solución acuosa con sales de fluoruro tales como NaF y KF	-Se utilizan tensiones de trabajo por encima de 25V -Este proceso aumenta significativamente el pH de la solución, lo que disminuye la velocidad de disolución de la capa de óxido obteniéndose NT con longitudes de hasta 6 μm		[132], [133]
3ª Generación	De naturaleza orgánica con sales de fluoruro y sin contenido de H_2O o en muy pequeñas cantidades	-En estos electrolitos se obtienen nanotubos con paredes extremadamente lisas, con longitudes comprendidas entre los nanómetros hasta 1 mm y diámetros de 750-800 nm -Capas de NT altamente organizadas		[132]
4ª Generación	Solución acuosa libre de fluoruros y con contenido de ácido oxálico, fórmico, sulfúrico o perclórico.	-Formación de NT agrupados en manojos densos sobre la superficie, no homogéneos y con espesores de capa que van desde los nm a μm -El crecimiento nanotubular en estas condiciones se produce de manera muy rápida -Es importante destacar que la morfología de los NT obtenidos es diferente a las tres generaciones citadas anteriormente		[132], [134]

- *Efecto del pH*

Con el aumento del pH, el proceso de hidrólisis de la capa de TiO_2 aumenta, haciendo que la velocidad de disolución química resulte más lenta. Por lo tanto, el tiempo requerido para formar un NT aumenta con el aumento del pH; en consecuencia; en electrolitos más ácidos la longitud del tubo será menor en comparación con los NT formados en electrolitos con un mayor pH (electrolitos orgánicos). En soluciones fuertemente ácidas ($\text{pH} < 1$), el aumento en el tiempo de anodizado no implica el aumento de la longitud de los NT debido a la alta disolución química. Sin embargo, en electrolitos menos ácidos, la longitud de los NT depende del tiempo de anodizado [132]. Por otro lado, la cantidad de sedimentos sobre la matriz nanotubular se ve influenciada por el proceso de disolución química, por lo que en soluciones ácidas ($\text{pH} < 3$) este contenido será menor que en soluciones con pH elevados.

- *Temperatura del electrolito*

La temperatura del electrolito afecta a la velocidad de disolución. Según se reporta en la bibliografía, el crecimiento de los tubos en soluciones acuosas ácidas parece ser inhibido a una temperatura inferior a los 2°C y en los medios de base orgánica, en donde se minimiza la disolución, es posible generarlos dentro de un rango de temperatura de 0 a 40°C . Mientras que el diámetro de los NT de TiO_2 en medios acuosos no depende de la temperatura, cuando se utiliza un electrolito orgánico, el diámetro aumenta al aumentar esta. Esto se debe porque, a medida que disminuye la temperatura la viscosidad del electrolito aumenta, reduciendo tanto la migración iónica de los iones como la disolución de TiO_2 en Ti por los iones F^- [135]. Por otro lado, se sabe que la temperatura de la disolución química tiene influencia en la calidad de la superficie. En un electrolito de primera generación, se observó que a 3°C las superficies resultan cubiertas con una gran cantidad de precipitados, mientras que a 20°C se muestran limpias [136].

- *Voltaje aplicado (V)*

La importancia del voltaje aplicado en el proceso de anodizado radica en que éste determina la fuerza del campo eléctrico a través de la capa de óxido y tiene un efecto directo sobre las reacciones de oxidación y disolución que se producen durante la formación de las estructuras nanotubulares. De forma general, el incremento de la tensión aplicada resulta en un aumento lineal de los diámetros internos y externos de los tubos. El diámetro pueden ser calculado asumiendo, desde el punto de vista de la oxidación, que la capa de óxido en forma de semiesfera crece con un radio de $r = f * V$, por lo que el diámetro es dos veces este radio; f es el factor de crecimiento de la capa compacta (que en el caso del TiO_2 estequiométrico toma el valor de $2,5 \text{ nm/V}$) y V es la tensión aplicada en voltajes [137], [138]. El potencial aplicado para crecer capas nanotubulares generalmente oscila entre 5-30V y de 10-60V en electrolitos acuosos y orgánicos, respectivamente. Esto se debe a que en electrolitos ácidos la velocidad de disolución es alta, debido al mayor pH (acidificación local) en la parte inferior de los tubos, por lo que si además se aplicara un potencial alto resultaría en una velocidad de disolución excesiva lo que finalmente produciría la disolución de la capa de óxido. El espesor de la capa barrera en la base del tubo también está directamente relacionado por la magnitud del potencial aplicado [118].

- *Tiempo de anodizado*

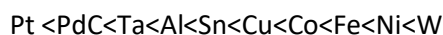
El tiempo de anodización es un parámetro clave para controlar la longitud de los tubos formados bajo tensión constante. Sin embargo, incluso para los electrolitos de tercera generación, la longitud final de la capa de nanotubos depende de la velocidad de disolución de los tubos formados. Así mismo cabe mencionar que la disolución longitudinal de los tubos

resulta en una disminución de las paredes. Muchas veces, este fenómeno lleva a la curvatura y colapso de la parte superior de los tubos, resultando en la formación de una capa superficial de tubos parcialmente disueltos. En la literatura, se pueden encontrar diversos nombres para esta, tales como “worm-like” o “nanograss” [137]. Por lo tanto, la identificación del tiempo de anodizado óptimo para un conjunto de condiciones dadas (tipo de electrolito, voltaje, temperatura, etc.) es fundamental para alcanzar la longitud máxima de los NT de TiO_2 . En un medio acuoso, donde las condiciones son agresivas, alcanza valores no superiores a unas pocas micras. En general, la longitud del NT se logra en minutos, sin embargo el tiempo de anodización puede durar de 30 min a 2 h para permitir que la estructura se reorganice y aumente el grado de auto-organización. También se ha reportado que un tiempo prolongado de anodización, en electrolitos de segunda generación, puede ser útil para obtener una superficie libre de precipitados [139].

- Efecto de los electrodos

El material del contraelectrodo (CE) que se utiliza en el proceso de anodización también influye en la formación de NT. Diferentes contraelectrodos producen nanotubos con diferentes morfologías [140]. El tipo de material del cátodo influiría además en la aparición de precipitados sobre de la superficie nanotubular.

El potencial sobre el cátodo es un factor crítico, que afecta a la cinética de disolución del ánodo de Ti, a su vez también en el control de la actividad del electrolito y la morfología de la capa nanotubular formada. Cuanto más Ti disuelto haya en el electrolito, mayor será la conductividad de este que a su vez ayuda a prevenir la formación de residuos en la superficie. La disposición de los materiales empleados como cátodos de acuerdo con su estabilidad en electrolitos acuosos es la siguiente:



Aparte de la naturaleza de los electrodos, la distancia entre el electrodo de trabajo (WE) y el CE también influye en la morfología de los NT de TiO_2 . Con una separación de los electrodos más pequeña, bajo condiciones fijas, se obtiene una alta conductividad del electrolito y de la concentración de titanio lo que produce un aumento en el diámetro y espesor de la pared de los NT y además una mayor distancia intertubular. Mientras que para el caso en el que el CE está muy lejos de WE, se produce una disminución significativa en el tamaño del tubo y un gran aumento en la cantidad de nanotubos obtenidos [141].

Rugosidad superficial

La rugosidad superficial es el conjunto de irregularidades de la superficie real, definidas convencionalmente en una sección donde los errores de forma y las ondulaciones han sido eliminados. Está determinada por las características del material y el proceso que formó la superficie [142].

El pulido mecánico consiste en frotar la superficie de la muestra sobre una serie de abrasivos cada vez más finos. Generalmente el proceso comienza con el desbaste o pulido grueso del metal con papeles de lija de carburo de silicio (SiC), para luego proseguir con la etapa de pulido fino con abrasivos con tamaños de partículas más pequeños como la pasta de diamante u óxidos como la suspensión de alúmina. Los estándares de abrasivos son definidos por diferentes normas de graduación: ANSI (American National Standard Institute), FEPA (Federation of European Producers of Abrasives) y JIS (Japanese International Standard). Además, los granos muy finos se clasifican en micrones, de acuerdo al rango de tamaño de

micra el cual, a su vez, se basa en un tamaño promedio de partículas. En la tabla 2.2 se compara el tamaño promedio de los granos de los abrasivos más usados para preparar las superficies de Ti según cada norma. La elección del tipo de abrasivo y las etapas en las que se llevará a cabo el procedimiento se determinan de acuerdo a propiedades físicas del material tales como la ductilidad y dureza.

Tabla 2. 2. Comparación de tamaños de granos de los abrasivos más usados para preparar Ti según distintas normas

Abrasivo	ANSI/CAMI	FEPA-P	[μm]
Lija al agua SiC	320	P500	33
Lija al agua SiC	600	P1200	14
Lija al agua SiC	1000	P2500	7,8
Lija al agua SiC	1500		3
Lija al agua SiC	2000		1
Suspensión de Alúmina			0,3
Pasta de diamante			0,25

Fuente: <http://www.fine-tools.com/G10019.html> _consultada 24/11/2017

El ataque químico, como método de pulido de la superficie de titanio, se emplea con el fin de eliminar la capa de óxido nativo que se forma en la superficie. Al aplicar el reactivo, las características de la estructura son reveladas como consecuencia de un ataque selectivo de la superficie. Esto se debe a que las distintas fases, así como los planos cristalográficos diferentemente orientados poseen diferencias en la susceptibilidad al ataque. En general aquellas regiones de la estructura donde la energía libre del sistema es mayor, como por ejemplo los límites de fases, bordes de grano, etc., son atacadas más rápidamente que las regiones monofásicas o ínter granulares. Los reactivos por lo general son soluciones ácidas o básicas débiles. En el caso del Ti c.p. se usa comúnmente H_2O_2 , HNO_3 y HF . El grado de ataque de una muestra es función de la composición, temperatura y tiempo de ataque. Para la determinación del reactivo se tiene en consideración el material y el objetivo buscado por el ataque. Existen las normas “American Society for Testing and Materials” (ASTM) para macroataque y microataque, E 304 y E 407, respectivamente.

En este trabajo, el pretratamiento de la superficie de Ti antes de la anodización se realiza con la finalidad de conferir a las muestras las mismas condiciones superficiales eliminando impurezas, manchas y rayones para obtener una superficie especular macroscópicamente. Entre los procedimientos que se emplean, los más comunes son el pulido mecánico, el pulido químico y el electropulido en diversos electrolitos. Actualmente, se han realizado estudios sobre el efecto del pulido del Ti y sus aleaciones con el fin de lograr que el crecimiento de la capa de óxido anódica resulte en una estructura altamente ordenada y con tubos bien definidos, encontrándose que el electropulido antes de la anodización es indispensable para la formación de este tipo de estructuras [143]. Si bien el proceso de electropulido resulta en una superficie de Ti microscópicamente brillante, limpia y suave; los electrolitos usados en este procedimiento son tóxicos e inflamables (ácido perclórico en metanol, ácido perclórico y ácido acético glacial). Por lo que algunos investigadores se están centrando en la búsqueda de mezclas menos nocivas [143].

Se estudió el efecto en la morfología de los nanotubos crecidos en electrolitos orgánicos en muestras de Ti c.p. sin pulido, con pulido mecánico, químico y electropulido [144]. Se encontró

que las dos condiciones primeras muestran superficies nanotubulares, mientras que las que fueron pulidas químicamente y electroquímicamente resultan con capas de óxido en la parte superior de los NT. Llegó a la conclusión de que la morfología de los nanotubos, la corriente de anodización y la capa barrera inferior están relacionadas con las condiciones de la superficie de Ti. Además, reportó que los nanotubos de TiO_2 crecidos en la superficie electropulida, una vez removida la capa de óxido superior, presentan una distribución homogénea, con formas redondeadas y tamaños uniformes. Asimismo, indicó que las muestras de Ti sin pulido y con pulido químico, al tener superficies más rugosas, presentan una capa barrera de óxido y morfología de los nanotubos no uniformes. En el caso del pulido mecánico; que se llevó a cabo mediante desbaste de la superficie con lijas de granulometrías #810-666 y acabado con pastas de diamante de 3 μm , 0,5 μm y 0,1 μm , resultó con una corriente inicial alta, una capa barrera de óxido plana y con nanotubos de tamaños no uniformes. Por otro lado, Jarosz junto a sus colaboradores estudiaron los mismos métodos de pulido pero centrándose en las características morfológicas de los nanotubos obtenidos, tales como tamaño, diámetro, circularidad, densidad de NT, y porosidad de la capa superior. Los resultados de este estudio indicaron que dichas características dependen del método de pulido, no así la disposición de los NT la cual resultó similar para todos los casos [145].

La influencia de la superficie en la formación de nanotubos de TiO_2 se ha informado comparando distintos tipos de pulido, a saber pulido químico, pulido mecánico, y electropulido. Sin embargo, no se encontraron publicaciones sobre el efecto de la rugosidad producida por distintos procedimientos mecánicos.

Limpieza

Durante el proceso de anodización, varios factores tales como el tiempo de anodización, tipo de electrolito y nivel de pH, pueden influir en la presencia de precipitados o sedimentos sobre la superficie de los nanotubos. Lo cual dificulta el llenado o recubrimiento de los tubos con otros materiales, a la vez que representa una posible fuente de contaminación si dichos sustratos anodizados pretenden ser usados en sistemas biológicos.

La limpieza por ultrasonido se basa en el principio de ondas de alta frecuencia (a partir de 20 KHz) producidas sobre un líquido que actúa como agente limpiante. Cuando las ondas ultrasónicas generadas por un transductor piezoeléctrico atraviesan un líquido, se forman continuas depresiones y sobrepresiones que aparecen y desaparecen en cuestión de microsegundos. Esto genera puntos altos y bajos de presión. Durante la etapa de baja presión se forman y crecen millones de microburbujas de vacío dentro del fluido, este efecto recibe el nombre de “cavitación ultrasónica”. Luego, durante la etapa de alta presión, las microburbujas implosionan generando durante una microfracción de tiempo una gran cantidad de energía que produce un efecto de ondas de choque que eliminan la suciedad, impurezas y contaminación en los objetos. La cavitación es afectada por muchos parámetros, como ser la temperatura, la frecuencia, la solución de limpieza, el tipo de fluido, entre otros.

En la bibliografía se propusieron tratamientos posteriores al anodizado tales como enjuagues con metanol, acetona, etanol, agua destilada, HCl, entre otros para asegurar la completa eliminación de los precipitados sobre la superficie nanotubular [146]. Además, algunos investigadores [128], [147] informaron que la agitación ultrasónica, en distintos medios, podría ser un método eficaz. Sin embargo, existe poca información sobre los parámetros del proceso (por ejemplo, tiempo de tratamiento y energía ultrasónica correspondiente) en los trabajos publicados. Otro método empleado es el de la doble o multi-etapa de anodización. La capa de

TiO₂ formada en la primera etapa se desprende mediante sonicación intensa para exponer el sustrato, y luego el sustrato con las huellas de los NT de Ti es sometido nuevamente a otra anodización, que resulta en la formación de matrices uniformes y con nanotubos con una morfología clara [148]. Sin embargo, esto último duplica el tiempo de fabricación de la capa nantubular en el sustrato de Ti.

Tratamiento térmico

Se conoce como tratamiento térmico al conjunto de operaciones de calentamiento y enfriamiento, bajo condiciones controladas de temperatura, tiempo de permanencia, velocidad y presión, de los metales o las aleaciones en estado sólido, con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas [149]. Cuando un metal es expuesto a un gas oxidante a temperaturas elevadas la oxidación de este puede ocurrir por la reacción directa con el gas sin la presencia de un electrolito líquido. La velocidad de ataque se incrementa sustancialmente con la temperatura y la película superficial típicamente aumenta como un resultado de la reacción en las interfaces óxido/gas u óxido/metal debido al transporte de cationes o aniones a través del óxido, el cual se comporta como un electrolito sólido.

El Ti es un material alotrópico, es decir, que puede existir en más de una forma cristalográfica. A temperatura ambiente presenta una estructura hexagonal compacta (fase α) cuya densidad es de 4,5 g/cm³. Sin embargo, a temperaturas superiores a 885°C sufre una transformación reversible a la estructura cúbica centrada en el cuerpo (fase β) con una densidad de 4,4 g/cm³.

El dióxido de titanio posee una estructura constituida por unidades básicas dadas por octaedros de TiO₆. Estos se conectan entre sí, de diversas maneras, por medio de vértices y aristas dando lugar a distintos polimorfos. Las tres formas más conocidas son rutilo, anatasa y brookita. Rutilo es la única fase estable, mientras que anatasa y brookita son metaestables y transforman a rutilo irreversiblemente por calentamiento[150]. Tanto el rutilo como la anatasa tienen una estructura cristalina tetragonal, mientras que brookita tiene una simetría ortorrómbica, como se muestra en la figura 2.5.

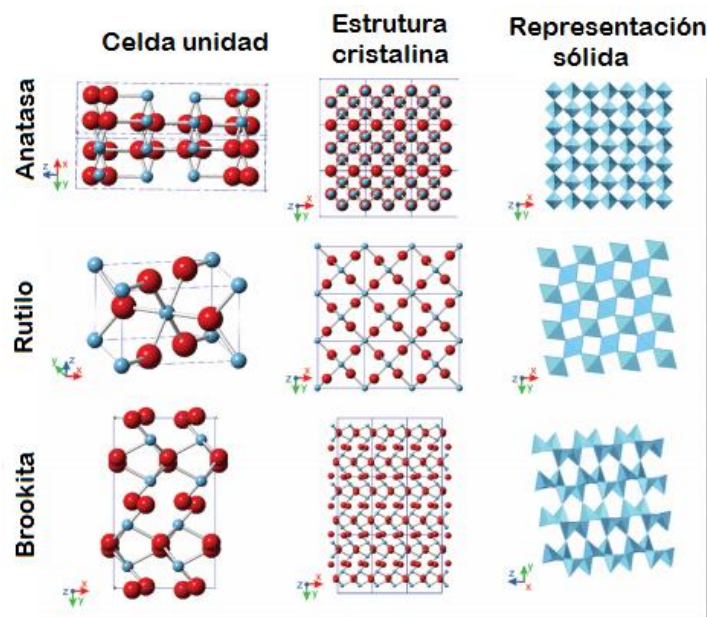


Figura 2. 5 Estructuras cristalinas de TiO₂, Anatasa, Rutilo y Brookita . Figura adaptada de [151]

Las propiedades funcionales del TiO_2 dependen de las características geométricas de éstos, así como de la fase cristalina del óxido. La estructura de la capa de NT crecida mediante anodizado puede ser amorfa o cristalina, lo cual depende en gran medida de los parámetros electroquímicos específicos como ser: el potencial aplicado, tiempo de anodización, temperatura del electrolito y/o de la velocidad de barrido de la rampa de potencial. Dependiendo entonces de las condiciones de anodización, las estructuras cristalinas que pueden presentar son: amorfa, anatasa, una mezcla de anatasa y rutilo [152] o rutilo [153].

Los NT de TiO_2 amorfos pueden transformarse a anatasa en atmósfera de aire a temperaturas tan bajas como 280- 300 °C. La cristalización de la fase anatasa aumenta con la elevación de la temperatura de calcinación y coexiste con la fase rutilo a 500 °C. Se ha sugerido al respecto, que los cristales de rutilo se desarrollan principalmente en la interfase metal/ TiO_2 , mientras que la fase dominante en las paredes de los tubos sería anatasa [124].

Según Lim [154], el recubrimiento nanotubular resulta térmicamente estable sin cambios perceptibles en las dimensiones de los nanotubos a temperaturas inferiores a 650°C . Por encima de esta, se produce una sinterización significativa de la capa nanotubular lo que ocasiona un cambio en la morfología y aspectos geométricos de los NT (diámetro, espesor de pared y longitud de tubo). A temperaturas superiores a 800 °C, el crecimiento de los granos y la oxidación del Ti da como resultado un completo colapso de la estructura nanotubular a densos cristallitos de rutilo.

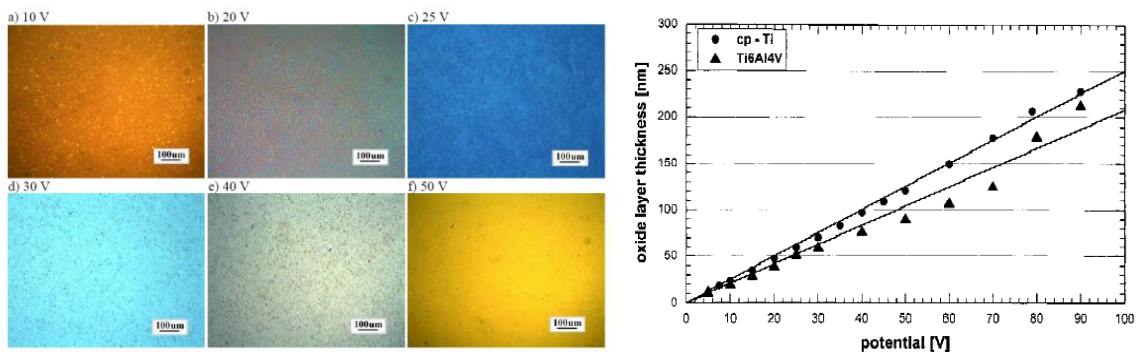


TABLE III
Colors of Oxide Layers after Anodic Oxidation

Layer Thickness (nm)	10–25	25–40	40–50	50–80	80–120	120–150	150–180	180–210
Color	golden	purple	deep blue	light blue	yellow	orange	purple	green

Figura 2. 6. Ti anodizado y con tratamientos térmico. a) Ti anodizadas a diferentes V [157]; b) Espesor de la capa de óxido anódico en función de V y c) colores de las capas de óxido luego del anodizado [156]

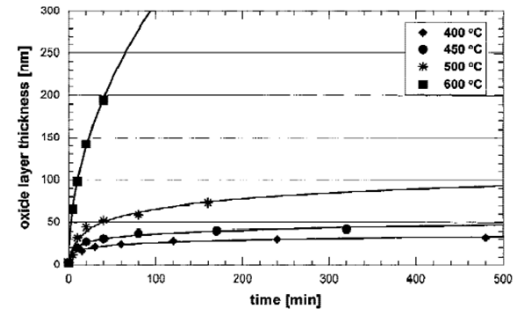


TABLE II
Colors of Oxide Layers after Thermal Oxidation

Layer Thickness (nm)	10–25	25–40	40–50	50–80
Color	golden	purple	deep blue	light blue

Figura 2. 7. Ti oxidado térmicamente a.) Espesor de la capa de óxido en Ti. después de la oxidación térmica en función de la temperatura y tiempo y b) colores de la capa luego de la oxidación [156]

Entre los factores que influyen en el proceso de transformación de fase se encuentran el aspecto geométrico de los tubos, derivado directo de las condiciones de preparación, y el área superficial [155].

Es conveniente mencionar que tanto la oxidación térmica como el anodizado electroquímico cambian el color de la superficie del Ti y sus aleaciones. Esto es resultado de la interferencia de la luz incidente sobre la capa de óxido. Cuando la luz blanca entra en contacto con la película superficial de óxido se produce un fenómeno de interferencia entre los rayos de luz reflejado en la superficie de la capa de óxido y los que penetran la misma y son reflejados en el sustrato metálico. Es posible obtener una amplia gama de colores dependiendo éstos principalmente del espesor de la capa de óxido, la cual, en el caso del anodizado electroquímico depende del voltaje aplicado (figura 2.6) mientras que en la oxidación térmica es función de la temperatura y el tiempo (figura 2.7) [61], [156], [157].

2.2. Materiales y Métodos

Preparación de electrodos de Ti

Para la preparación de los sustratos se empleó una placa de titanio c.p. grado 2 con dimensiones 326x51x1 mm³ (Roberto Cordes S.A., Buenos Aires, Argentina). Se cortaron las muestras de forma cuadrangular con sus lados de 5x5 mm² usando una cortadora de precisión (Minitom, Struers, Rodovre, Dinamarca) montada con un disco de filo diamantado (Cygnus, Buenos Aires, Argentina) y utilizando abundante refrigeración. El líquido refrigerante se preparó con una relación 1:25 partes de líquido de corte (Cutting fluid, Struers, Rodovre, Dinamarca) y agua.

Posterior al corte, los sustratos fueron limpiados sucesivamente en acetona (99,5% RA (ACS), Anedra 6005, Buenos Aires, Argentina), alcohol isopropílico (Pro-análisis (ACS), Laboratorio Cicarelli 927, Santa Fe, Argentina) y agua destilada durante 5 min utilizando una lavadora ultrasónica (55 KHz/ 21 W, Cole-Parmer, Vernon Hills, U.S.A.). Luego, se contactó eléctricamente una de las caras del sustrato con un cable de cobre de 15 cm de longitud usando una pintura conductora a base de plata (Electroquímica Delta, Buenos Aires, Argentina). Los sustratos se incluyeron en acrílico autocurable (polímero y monómero, Vaicel, Buenos Aires, Argentina), de modo que la cara no contactada quedara expuesta. Para ello se utilizaron como moldes tubos de plástico (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) de 1,5cm de largo, de manera de poder tener cada una de las muestras individualizadas y poder utilizarlas como electrodo. La figura 2.8 muestra un esquema de los electrodos montados e incluidos.

Los sustratos incluidos fueron pulidos en una pulidora metalográfica de precisión (ECOMET 3000 + AutoMet 2000, Buehler, Illinois, U.S.A.), a 80 rpm, 5N de fuerza y sentido de giro de la lija contrario al del plato porta muestra. Se utilizó papel de lija de SiC de granulometría 320, 600, 1000, 1500 y 2000 (nomenclatura ANSI), suspensión de alúmina de 1µm, suspensión de alúmina 0,3 µm (ARO S.A., Bs. As., Argentina) y pasta de diamante 0,25µm (DP-Paste P, Struers, Dinamarca). Posteriormente, los electrodos de Ti pulidos se limpiaron sucesivamente durante 5min, en baño ultrasónico (B200, Branson, Connecticut, USA) con alcohol isopropílico (Pro- análisis (ACS), Laboratorios Cicarelli 927, Santa Fe, Argentina) y agua destilada. Inmediatamente después, las muestras se secaron con papel secante. Cabe aclarar que el pulido final fue uno de los parámetros estudiados en la presente tesis por lo que futuras modificaciones en la secuencia de pulido serán aclaradas oportunamente.

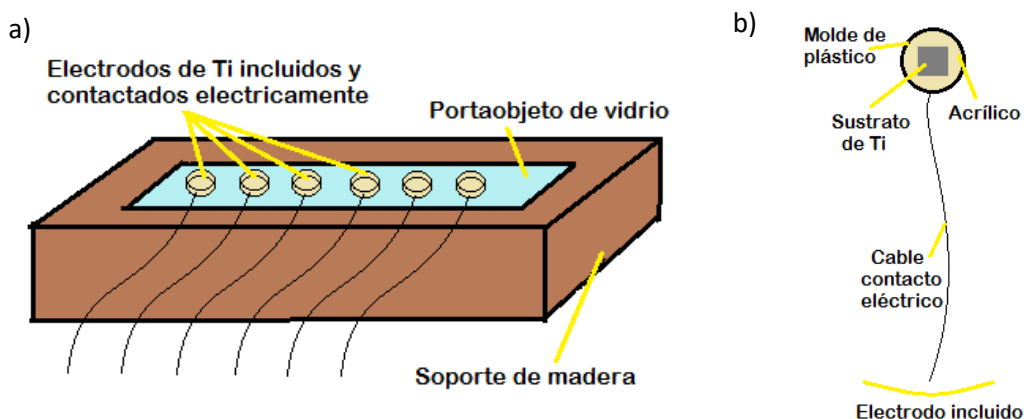


Figura 2. 8. Sustratos incluidos. a) Esquema de inclusión en resina acrílica de las muestras, b) electrodo final incluido y contactado eléctricamente

Preparación de las soluciones

Para todas las soluciones se utilizó agua destilada a partir de un destilador eléctrico (Tecno Dalvo, LAMEIN – UNT, Tucumán) de nuestro laboratorio. Algunas de las siguientes soluciones fueron objeto de estudio de la presente tesis por lo que las concentraciones finales utilizadas serán aclaradas oportunamente.

- *Solución de pulido químico:* Se preparó una solución acuosa de decapado con una concentración de HF 1% y HNO₃ 1% utilizando ácido fluorhídrico 40% (HF Pro-Análisis, Laboratorios Cicarelli, Santa Fe, Argentina) y ácido nítrico 70% (HNO₃ Pro- Análisis, Laboratorios Cicarelli, Santa Fe, Argentina).
- *Solución de detenimiento:* Se preparó una disolución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH perlas, Reactivo Baker ACS, Estado de México, México) con una concentración de 5,1 M. La misma fue sonicada hasta la completa disolución de las perlas.
- *Solución de trabajo ácido fluorhídrico (HF):* A partir de una solución comercial concentrada de HF al 40% (Pro-Análisis, Laboratorios Cicarelli, Santa Fe, Argentina), se obtuvo la concentración deseada de HF 0,5%. Además, se agregó 2,08±0,02 g de NaOH (perlas, Reactivo Baker ACS, Estado de México, México).
- *Solución de ácido clorhídrico (HCl):* A partir de una solución comercial de HCl 36,5-38% con P.M.: 36, 46 [gr/mol] y D: 1,19 [g/ml] (Pro-análisis ACS, Laboratorios Cicarelli, Santa Fe, Argentina) se obtuvo la solución de HCl 0,1M.

Anodizado electroquímico

El electrodo de Ti fue sumergido en una solución de pulido químico HF 1% y HNO₃ 1% durante 5 min y luego fue lavado con abundante agua destilada. Para el anodizado electroquímico se empleó una celda electroquímica bipolar, en la que el ánodo fue el electrodo de titanio y el cátodo una chapa de platino (Pt) de 7x7 mm² incluida en acrílico. Ambos fueron montados en un soporte con la finalidad de mantenerlos enfrentados y separados una distancia de 1cm. Se usó como electrolito la solución de trabajo con HF. Se procedió a realizar el crecimiento anódico de la película de óxido a temperatura ambiente aplicando un voltaje de tensión continua durante un tiempo de 10 min. Para ello se empleó una fuente de alimentación (Labornetzgerät DIGI 40, 0-40V/5A, Voltcraft, Alemania) conectada a ambos electrodos. Inmediatamente luego de cumplirse el tiempo de anodizado se adicionó 1ml de solución de detenimiento de NaOH y posteriormente el electrodo fue lavado con abundante agua destilada.

A continuación, se detallan diferentes experimentos realizados para la optimización del protocolo final de fabricación de NT de TiO₂.

Efecto de la rugosidad superficial del sustrato de Ti en la morfología de los NT de TiO₂

Para este estudio las condiciones de anodizado utilizadas fueron: concentración de la solución de trabajo de 0,5% de HF, voltaje de anodizado de 20 V y solución de pulido fresca para cada electrodo. Seguidamente al anodizado las muestras fueron colocadas por 1 h en una solución de limpieza de 0,1M de HCl.

Con el objetivo de conocer cómo influye la rugosidad inicial que se toma de partida para la fabricación de los nanotubos de TiO_2 , se estudiaron 3 grupos con diferentes acabados superficiales (n=4) resumidos en la tabla 2.3

Tabla 2. 3. Influencia de la rugosidad superficial en la morfología de los NT de TiO_2

Lija granulometría 2000	Grupo I
Suspensión de alúmina 0,3 μm	Grupo II
Pasta de diamante 0,25 μm	Grupo III

Para pulir las muestras con suspensión de alúmina, se utilizó un paño afelpado y como líquido refrigerante agua destilada. El proceso se llevó a cabo de manera manual. Para realizar el acabado fino con pasta de diamante, también se utilizó un paño afelpado y se lubricó con etilenglicol (Para análisis, Dorwil, Buenos Aires, Argentina). En este caso, el paño fue montado en el plato de una pulidora metalográfica (Marex, LAFISO-FACET, UNT, Tucumán). Los electrodos pulidos se limpiaron sucesivamente durante 5 min, en baño ultrasónico (B200, Branson, Connecticut, USA) con alcohol isopropílico (Pro-análisis (ACS), Laboratorios Cicarelli 927, Santa Fe, Argentina) y agua destilada. Inmediatamente después, se secaron con papel secante.

La caracterización de las muestras se realizó cualitativa y cuantitativamente luego de desincluir las muestras. La primera se realizó observando las superficies con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Supra 55VP, Zeiss, CIME, Tucumán). Todas las micrografías se obtuvieron con una magnificación de 2,5kX y 50kX. Por otro lado, la determinación cuantitativa de la rugosidad superficial se llevó a cabo con un rugosímetro bidimensional de contacto (Taylor Hobson, GlyA “Laboratorio Tandar”, CNEA, Buenos Aires). Se realizaron 3 lecturas de rugosidad en distintas direcciones para cada una de las muestras con un recorrido en longitud de 3,1 mm. La cuantificación de los parámetros de rugosidad superficial se efectuó con el software Ultra a partir del perfil de rugosidad modificado (perfil R).

Se calcularon valores para dos parámetros de descripción vertical (o altura) del perfil R: R_a y R_z . Las descripciones y los cálculos de estos parámetros se realizaron de acuerdo con la norma ISO 4287:1997 como se indica a continuación:

- R_a (media aritmética de las desviaciones del perfil): es la media aritmética del valor absoluto de las distancias desde la línea media al perfil R (Y_i) dentro de la longitud de muestra. R_a se expresa en micrómetros (μm).

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |Y_i|$$

- R_z (altura de diez puntos irregulares): es el valor medio del valor absoluto de los 5 picos más altos (Y_{pi}), más el valor medio del valor absoluto de los cinco valles más profundos (Y_{vi}), dentro de la longitud de muestra. R_z se expresa en micrómetros (μm).

$$R_z = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^N Y_{pi} + \frac{1}{5} \sum_{i=1}^N |Y_{vi}|$$

Los valores de R_a y R_z se obtuvieron como un promedio de los resultados medidos en cada muestra para tres direcciones diferentes.

Una vez caracterizadas las superficies se procedió a anodizar los electrodos. Luego del anodizado los electrodos fueron secados en una estufa a 60°C por 1h. Seguidamente, las chapas con el tratamiento superficial fueron desincluidas y almacenadas en recipientes herméticos.

Para la caracterización morfológica, las muestras fueron observadas en el MEB a 5 kV usando el detector de electrones secundarios IN LENS. Se mantuvo fija la distancia entre la parte inferior del lente objetivo y la superficie de la muestra, distancia de trabajo (WD), en 5 mm. Se obtuvieron micrografías con una magnificación de 2,5k X, 50kX y 100kX. El análisis de imágenes se realizó con el programa ImageJ versión 1.49v [158] y se evaluaron parámetros geométricos de la nanoestructura tales como el área de la sección interna del tubo, densidad y fracción de área ocupada por los NT de TiO₂. El área de la sección interna se calculó a partir de 4 imágenes MEB distintas para cada abrasivo. La densidad de NT de TiO₂ se calculó como el número total de tubos que hay en una determinada área de una imagen MEB y la fracción de área cubierta como el espacio ocupado por los nanotubos. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y para identificar diferencias significativas entre los tres grupos se utilizó como contraste post-hoc la prueba de comparaciones múltiples de a pares de Dunnett-Tukey-Kramer, con un 95% de confianza. El análisis de datos estadístico se realizó con el software R versión 3.2.2 y con el paquete DTK package [159].

Métodos de limpieza de la superficie con NT de TiO₂

Para optimizar el procedimiento de fabricación y evaluar la mejor manera de obtener muestras con nanotubos de TiO₂ perfectamente limpios y sin depósitos sobre ellos se estudiaron tres técnicas diferentes, las mismas están resumidas en la tabla 2.4. Para este estudio las condiciones de anodizado utilizadas fueron: Concentración de la solución de trabajo de 0,5% de HF y voltaje de anodizado de 20 V. Además, se utilizó solución de pulido fresca para la fabricación de cada electrodo.

Tabla 2. 4. Diferentes métodos de limpieza de las muestras de nanotubos de TiO₂

Efecto de la solución de pulido químico	Control (sol. común)	Grupo IV
	Sol. fresca	Grupo V
Limpieza son ultrasonido	Control (sin sonicar)	Grupo VI
	2 seg	Grupo VII
	30 seg	Grupo VIII
	2 min	Grupo IX
	5 min	Grupo X
Limpieza con solución de HCl 0, 1M	Control (sin limpieza)	Grupo XI
	Sol. De HCl 0,1M (1h)	Grupo XII

- Efecto de la solución de pulido químico

Para los electrodos del Grupo IV se empleó sucesivamente la misma *solución de pulido químico HF 1% y HNO₃ 1%*, mientras que para los del Grupo V se utilizó solución fresca, 3 ml, para cada electrodo. Luego del procedimiento se lavaron con abundante agua destilada. El tiempo de inmersión de cada electrodo fue de 5 min. Inmediatamente después se procedió con el *anodizado electroquímico*. Luego, los electrodos se secaron en estufa de laboratorio a 60°C por 1h. Las chapas con el tratamiento superficial fueron desincluidas y almacenadas en recipientes herméticos. La evaluación morfológica se realizó con un MEB y su detector de electrones secundarios IN LENS a 5 KV, WD= 5mm y con magnificación de 15kX, 50kX y 100kX.

- Limpieza por ultrasonidos

Las muestras fueron primeramente anodizadas y luego sometidas a diferentes tiempos de sonicado a saber: Grupo VI Sin sonicar (control), Grupo VII: 2 seg, Grupo VIII: 30 seg, Grupo IX: 2 min y Grupo X: 5 min de sonicado.

Se utilizó el método indirecto de limpieza, por lo que los electrodos fueron colocados en un vaso de precipitado de vidrio tipo Griffin de 20 ml al cual se le adicionó 2 ml de agua destilada, luego este fue sumergido en baño ultrasónico (B200, Branson, Connecticut, USA) de 40 kHz y 19 W durante los tiempos establecidos. Seguidamente, los electrodos fueron secados en estufa a 60°C durante 1 h. Las muestras desincludas del acrílico fueron almacenadas en recipientes herméticos. La evaluación morfológica se realizó con MEB con un detector de electrones secundarios IN LENS a 5 kV, WD= 5mm y con magnificación de 15kX, 50kX y 100kX. Las muestras de los Grupos IX y X se observaron con un microscopio metalográfico (Olympus BX-60M, LAFISO-FACET-UNT, Tucumán) y se tomaron fotografías de estas con una cámara digital (Sony Exwave). Todas las muestras fueron analizadas composicionalmente mediante Espectroscopia de Energía Dispersiva de rayos X (EDS) con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Supra 55VP, Zeiss, CIME, Tucumán) equipado con un detector de energía dispersiva de rayos X (Inca Energy 250, Oxford instruments).

- Limpieza con solución de HCl 0, 1M

En una primera instancia se anodizaron los electrodos y se lavaron con abundante agua destilada. Se separaron en dos grupos, Grupo XI para electrodos de control (los cuales se almacenaron en un recipiente hermético hasta posterior análisis) y el Grupo XII que fueron sumergidos primeramente en alcohol isopropílico (Pro-análisis (ACS), Laboratorios Cicarelli 927, Santa Fe, Argentina) durante 2 min, luego en una solución de HCl 0,1M durante 1 h [160] y finalmente lavados con agua destilada. Todos los electrodos fueron secados en estufa de laboratorio a 60°C durante 1 h. Por último, las chapas se desincluyeron y almacenaron con mucho cuidado. La evaluación morfológica se realizó con un MEB usando el detector de electrones secundarios IN LENS a 5 kV, WD= 5mm y con magnificación de 15kX, 50kX y 100kX.

Efecto del tratamiento térmico en la estructura nanotubular

Para estudiar el efecto de un tratamiento térmico sobre la capa de óxido preparada mediante anodizado electroquímico los electrodos fueron primeramente anodizados electroquímicamente en una solución acuosa de trabajo de 0,5% HF y con un voltaje de anodizado de 20V, usando para cada electrodo una solución de pulido químico fresca, posteriormente fueron limpiados en una solución de HCl 0,1 M y secados en estufa de laboratorio a 60 °C durante 1h. Luego, las muestras fueron desincludas del acrílico y separadas en 3 grupos (n=3) según el tipo de tratamiento térmico a implementar, a saber: Grupo XIII: sin tratamiento térmico, Grupo XIV: con tratamiento en atmósfera de aire a 450 °C y Grupo XV: con tratamiento térmico en atmósfera de aire a 650 °C. La tabla 2.5 resumen los tratamientos empleados.

Tabla 2. 5. Efecto del tratamiento térmico por 3 h sobre la capa de nanotubos de TiO₂

Control (sin tratamiento térmico)	Grupo XIII
450 °C	Grupo XIV
650 °C	Grupo XV

Se realizó en un horno de cámara (CAB-CNEA, LAFISO, Tucumán) con una rampa de calentamiento de 2 °C/min por 3 h. Los sustratos fueron colocados sobre un soporte de cerámica dentro de la cámara del horno antes de comenzar a correr el programa seleccionado y retirados de esta una vez que la temperatura de la cámara alcanzó temperatura ambiente nuevamente. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en recipientes herméticos. Para la caracterización de las muestras las mismas fueron observadas a nivel macroscópico con un microscopio metalográfico (BX-60M, Olympus, LAFISO-FACET-UNT, Tucumán) a 12,5X, 25X y 50X y se tomaron fotografías de las mismas con una cámara digital (Sony Exwave). A nivel microscópico se utilizó un MEB con un detector de electrones secundarios IN LENS a 5 kV, WD= 5 mm y con magnificación de 15kX, 50kX y 100kX. Además, las muestras fueron analizadas con un equipo de espectroscopia Raman (DXR, Thermo scientific, LERa, CCT CONICET-UNT, Tucumán). Se empleó un láser de 532 nm, con un nivel de potencia de 9 mV, red de difracción de 900 líneas/mm y apertura confocal seleccionada en 50 µm. El espectro es el resultado de 40 exposiciones, cada una de 2 seg. Para este tipo de análisis, no fue necesario un tratamiento especial de las muestras. Los espectros fueron analizados con el software OMNIC For Dispersive Raman (versión 8.3.103, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Efecto de la concentración de HF de la solución de trabajo en la formación de NT de TiO₂

Para este estudio los electrodos de Ti fueron preparados utilizando el protocolo descrito anteriormente haciendo uso de una solución de decapado fresca para cada sustrato, voltaje de anodizado de 20V y una solución de limpieza de HCl 0,1M en la cual el electrodo fue sumergido por 1 h. Con el objetivo de optimizar la concentración de HF de la solución de trabajo durante la fabricación de los NT de TiO₂, se dejaron fijos todos los demás parámetros y se varió la concentración estudiando los siguientes grupos, Grupo XVI: 0,3% de HF, Grupo XVII: 0,5% de HF, Grupo XVIII: 0,82% de HF y Grupo XIX 1% de HF, con n=3. La tabla 2.6 presenta los grupos muestrales de estudio. Caracterización de las muestras con nanotubos de TiO₂ se realizó cualitativamente empleando un MEB para evaluar la morfología de la capa de óxido generada, todas las imágenes fueron tomadas con una magnificación de 100kX.

Tabla 2. 6. Efecto de la concentración de la solución de trabajo

0,3 % de HF	Grupo XVI
0,5 % de HF	Grupo XVII
0,82 % de HF	Grupo XVIII
1 % de HF	Grupo XIX

Efecto del voltaje de anodizado en el diámetro de los NT de TiO₂

Para este estudio los electrodos de Ti fueron preparados utilizando el protocolo descrito anteriormente haciendo uso de una solución de decapado fresca para cada sustrato, concentración de la solución de trabajo de 0,5% HF y una solución de limpieza de HCl 0,1M en la cual el electrodo fue sumergido por 1 h. Aquí el voltaje de anodizado fue variado y se estudió el efecto de este parámetro en la morfología de los NT de TiO₂. Los grupos muestrales estudiados fueron: Grupo XX: 2,5V, Grupo XXI: 5 V, Grupo XXII: 10 V, Grupo XXIII: 15 V, Grupo XXIV: 20 V y Grupo XXV: 25 V. La tabla 2.7 resume los grupos de estudio (n=3) estudio. La caracterización morfológica de los nanotubos de TiO₂ se realizó empleando un MEB y el análisis composicional de los mismos fue estudiado por medio de EDS. Todas las micrografías se obtuvieron con una magnificación de 100kX para poder realizar las mediciones de los diámetros internos de los nanotubos. El análisis de imágenes se realizó con el programa ImageJ

versión 1.49v [158]. El área de la sección interna se calculó a partir de 4 imágenes MEB distintas para cada muestra.

Tabla 2. 7. Efecto del voltaje de anodizado en el diámetro de los NT de TiO₂

2,5 V	Grupo XX
5 V	Grupo XXI
10 V	Grupo XXII
15 V	Grupo XXIII
20 V	Grupo XXIV
25 V	Grupo XXV

Formación de microcanales paralelos en la superficie de los sustratos de Ti previo a la formación de NT

Aquí se estudia una modificación superficial en forma de microcanales que luego (en los siguientes capítulos) se tomará como sustrato base para la formación de NT de TiO₂.

Para este estudio la preparación de los sustratos se realizó siguiendo el procedimiento descrito previamente en “Preparación de electrodos de Ti” pero modificando la superficie previa al anodizado electroquímico. Brevemente, los sustratos de Ti fueron cortados en forma cuadrangular de 5x5mm² a partir de una placa de Ti c.p. grado 2 usando una cortadora de precisión montada con un disco de filo diamantado y abundante líquido de refrigeración. Una vez cortadas las muestras los sustratos fueron limpiados sucesivamente en acetona, alcohol isopropílico y agua destilada durante 5 min. Luego fueron contactados eléctricamente e incluidos en resina acrílica. Posteriormente los sustratos fueron pulidos en una pulidora metalográfica de precisión con lijas al agua de SiC de granulometría 320, 600, 1000, 1500 y 2000; y luego pulido con suspensión de alumina de 1 µm y de 0,3 µm.

A partir de estos sustratos se realizó un lijado final a diferentes granulometrías (lijas de 120, 180, 320 y 600 granos/cm²) de manera de obtener superficies microacanaladas con rugosidades micrométrica.

Los sustratos estudiados aquí corresponden al Grupo XXVI: Formación de microcanales, en donde tenemos la muestra control (acabado espejo pulido con alumina de 0,3 µm), muestra lijada con lija de papel 100 (L100), con lija de papel 180 (L180), con lija de papel 320 (L320) y con lija de papel 600 (L600). La tabla 2.8 muestra las superficies microacanaladas formadas.

Tabla 2. 8. Estudio de la incorporación de una microrugosidad en forma de microcanales a las muestras previo al anodizado

Control (Ti pulido)	Grupo XXVI
L100	
L180	
L320	
L600	

Para la obtención de los diferentes patrones microacanalados se utilizó la pulidora automática (Buehler Automed 2000) con la respectiva lija de SiC con la granulometría deseada. Las muestras incluidas fueron apoyadas en un borde del contraplato giratorio de la pulidora durante 15 seg.

Para la caracterización de las muestras las mismas fueron observadas a nivel macroscópico con un microscopio metalográfico (BX-60M, Olympus, LAFISO-FACET-UNT, Tucumán) a 12,5X, 25X y

50X y se tomaron fotografías de las mismas con una cámara digital (Sony Exwave). La rugosidad fue analizada con un perfilómetro de contacto Taylor Hobson Precision perteneciente al Laboratorio Tandem del Centro Atómico Constituyentes (CNEA, Argentina). En cada muestra se tomaron 5 mediciones de 2 mm de longitud cada una en dirección perpendicular a los microcanales realizados. Se analizaron 5 especímenes de cada muestra y se obtuvieron los valores de Ra y Rz. Los cálculos de los parámetros fueron realizados de acuerdo con la norma ISO 4287:1997. Se decidió analizar estos parámetros ya que Ra representa uno de los valores más comúnmente utilizados para la caracterización de la rugosidad lo cual permitirá futuras comparaciones con valores encontrados en la bibliografía; y Rz da una idea de la altura de las irregularidades de la superficie, el detalle del cálculo de ambos parámetros fue expuesto anteriormente.

2.3. Resultados y Discusión

Considerando la bibliografía y la diversidad de métodos descritos para la fabricación de NT de TiO_2 , tal cual se mencionó en la introducción de este capítulo, una etapa crucial en este estudio fue la elección de un método de síntesis factible para nuestro propósito. Por ello la tabla 2.9 compara los dos métodos más comúnmente utilizados para la fabricación de NT de TiO_2 y justifica la elección del método electroquímico en esta tesis doctoral.

Básicamente, el método hidrotérmico para la síntesis de NT de TiO_2 utiliza como precursores polvo de TiO_2 en una solución con NaOH que luego será autoclavado durante varias horas, seguido de un tratamiento ácido en HCl [161]–[163]. La formación de la geometría del tubo se basa en la exfoliación de planos cristalinos de TiO_2 en un ambiente alcalino y su estabilización como Ti-O-Na^+ . Seguidamente estas nanocapas se enrollan entre ellas formando tubos luego de un enfriamiento controlado o un tratamiento de HCl. En contraposición, el proceso de anodización electroquímica consiste en la modificación de la superficie de un sustrato de Ti a través de un potencial y una celda electrolítica, tal cual se ha detallado previamente en este capítulo.

En la síntesis hidrotérmica las partículas se obtienen en un medio líquido y es necesario agregar un último paso para la recuperación de las partículas en forma sólida, lo cual involucra evitar aglomerados por medio de etapas de congelamiento o adición de polímeros estabilizantes o surfactantes al inicio o final del proceso, los que a su vez pueden quedar retenidos en las partículas y ser fuente de toxicidad [164]. Sin embargo, la mayor dificultad consiste en la recuperación aislada de las partículas en forma sólida. En contraste, cuando se sintetizan los NT mediante anodizado electroquímico los mismos crecen en la superficie del sustrato formando parte del volumen total. Por otro lado, una de las principales ventajas del proceso hidrotérmico es la síntesis directa de partículas cristalinas [164], [165] mientras que para el método de anodizado los nanotubos obtenidos son normalmente de tipo amorfo. Sin embargo, es posible obtener, en algunos casos, estructuras cristalinas agregando etapas de pre-anodizado [166] y alterando los parámetros de procesamiento [167], normalmente para electrolitos no acuosos. Además, si bien ambos utilizan temperaturas relativamente bajas, la síntesis electroquímica puede ocurrir a temperatura ambiente lo cual evita incorporar equipos de control térmico al set experimental volviéndolo un proceso más simple y económico.

En esta tesis doctoral se estudia la fabricación de NT de TiO_2 para ser usado en implantes médicos, por lo que un punto clave para la elección del método de anodizado electroquímico fue la ventaja de este para sintetizar los NT directamente en la superficie del sustrato metálico formando parte del volumen completo del implante convirtiéndose así en una modificación superficial y no meramente en recubrimiento. Otro punto a favor es que el anodizado electroquímico permite obtener capas nanotubulares perfectamente organizadas, en las cuales es posible controlar el diámetro fácilmente, lo cual representa un valor agregado a nuestro producto, considerando que podría permitir la deposición e incorporación de diferentes materiales sobre y dentro de los NT lo que permitiría cambiar las propiedades del sustrato. Respecto a esto último, la literatura reporta diferentes casos en donde los NT han sido cubiertos o rellenos con diversos materiales para ser usados en diferentes aplicaciones [168]–[170].

Tabla 2. 9. Comparación entre los dos métodos más comúnmente usados para síntesis de NT de TiO_2

	Síntesis hidrotérmica	Síntesis por anodizado electroquímico
Ventajas	<p>-Permite obtener partículas cristalinas nanométricas de gran uniformidad y consiste en un método de síntesis rápida y alto rendimiento. Es un método simple para obtener partículas en suspensión</p> <p>-Permite la formación de partículas en dimensiones nanométricas. El producto final consiste en estructuras tubulares multicapas con las siguientes dimensiones promedios diámetro interno = 5 nm diámetro externo = 10 nm espaciado entre capa < 1 nm longitud = decenas a cientos de nm</p> <p>-El tamaño, morfología y la cantidad de NT puede ser controlado alterando las variables de procesamiento</p> <p>-Bajos niveles de contaminación provenientes de los materiales precursores</p>	<p>-Permite la formación de estructuras porosas o tubulares abiertas en su parte superior y cerradas y unidas al sustrato por su parte inferior. Es un método rápido de un solo paso, y necesita de soluciones de trabajo con iones F^- para la formación de las nanoestructuras</p> <p>-Permite la obtención de NT ordenados a partir de un sustrato de Ti con las siguientes dimensiones aproximadas: diámetro de pocos nm a 700nm (controlado linealmente con el V) longitud: desde pocos nm hasta cientos de μm</p> <p>-La longitud, diámetro, espesor de pared, morfología y separación de los tubos puede ser controlado alterando las variables de procesamiento.</p> <p>-Bajos niveles de contaminación provenientes de los materiales precursores</p> <p>- Se utiliza un voltaje constante, para electrolitos acuosos de 1-30 V y para electrolitos no acuosos de 5-150 V</p> <p>-El procedimiento puede durar desde minutos hasta algunas horas</p>
Desventajas	<p>-Temperaturas de procesamiento varían entre 60-500 C</p> <p>-Puede involucrar uno o dos etapas</p> <p>- uso de estabilizantes o surfactantes para evitar aglomerados en solución</p> <p>- se necesita aumentar una etapa final para la obtención de partículas solidas</p> <p>-Ciertos materiales precursores son costosos</p> <p>-El procedimiento puede durar varias horas</p>	<p>-Normalmente se obtienen estructuras nanotubulares amorfas, pero bajo ciertas condiciones es posible obtener estructuras cristalinas de TiO_2 usando electrolitos orgánicos o añadiendo etapas de pre-anodizado</p> <p>-Las nanoestructuras pueden estar cubiertas en su parte superior por formaciones y restos de óxido</p> <p>-En electrolitos no acuosos es necesario hacer un doble anodizado, descartando la primera capa, para obtener los NT perfectamente alineados</p>

La figura 2.9 (a) muestra los sustratos de Ti cortados previo a la inclusión y preparado de los electrodos, la figura 2.9 (b) muestra una fotografía de los electrodos luego de su montaje e inclusión. Se puede observar como solo una cara del sustrato de titanio queda expuesta y es la que será modificada en los futuros experimentos. La cara posterior del Ti se encuentra en contacto eléctrico con el cable y el resto del sistema se encuentra aislado por medio de la resina acrílica

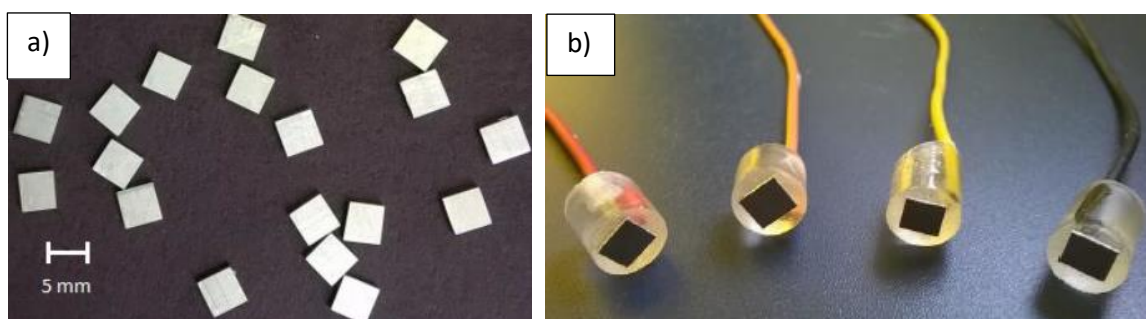


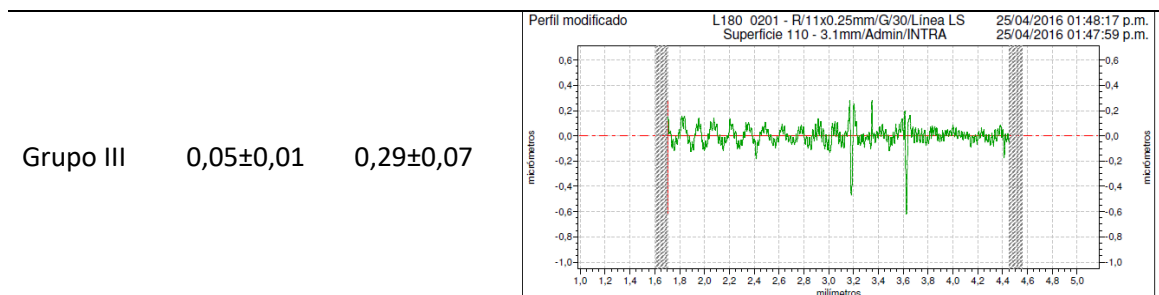
Figura 2. 9. Muestras de titanio. (a) Sustrato de Ti c.p. post-corte con dimensiones de $5 \times 5 \times 1 \text{ mm}^3$ (b) Fotografía de los electrodos luego del montaje e inclusión. Solo una de las caras del titanio queda expuesta para ser tratada en los futuros experimentos

Efecto de la rugosidad superficial del sustrato de Ti en la morfología de NT de TiO_2

La tabla 2.10 detalla los valores de rugosidad promedio (R_a) y de profundidad media (R_z) para diez puntos obtenidos de las muestras del Grupo I, Grupo II y Grupo III, así como los perfiles de rugosidad logrados para cada caso. Como era de esperar las muestras tratadas con abrasivos con un mayor tamaño de grano, Grupo I, resultaron con una mayor rugosidad superficial mientras que el valor para las otras dos, Grupo II y III, fue menor, respectivamente.

Tabla 2. 10. Valores de rugosidad de las superficies tratadas con distintos abrasivos

Muestras	Parámetros		Perfiles
	$R_a [\mu\text{m}]$	$R_z [\mu\text{m}]$	
Grupo I	$0,15 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,11$	<p>Perfil modificado L180 0201 - R/11x0.25mm/G/30/Linea LS 25/04/2016 01:20:13 p.m. Superficie 94 - 3.1mm/Admin/INTRA 25/04/2016 01:19:56 p.m.</p>
Grupo II	$0,11 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,08$	<p>Perfil modificado L180 0201 - R/11x0.25mm/G/30/Linea LS 25/04/2016 01:30:30 p.m. Superficie 99 - 3.1mm/Admin/INTRA 25/04/2016 01:30:13 p.m.</p>



La figura 2.10 muestra las micrografías MEB de los sustratos de titanio con distintas condiciones de pulido mecánico, pertenecientes al Grupo I, II y III; como así también las imágenes MEB de dichos sustratos luego del pulido químico en solución de 1% HF/HNO₃ (etapa inicial del proceso de anodizado electroquímico) para comparación.

Las superficies de las muestras del Grupo I (figura 2.10 (a)) presentaron pequeños poros y grietas distribuidos al azar; además de huellas ásperas, producto del desbaste. Las muestras del Grupo II (figura 2.10 (c)) y Grupo III (figura 2.10 (e)) mostraron una superficie plana y uniforme con algunos surcos de poca profundidad. En general las micrografías MEB de los sustratos indican que el pulido mecánico con pasta de diamante ofrece mayor planitud, lo cual corrobora las medidas de rugosidad. También se observaron en las superficies metálicas inclusiones de pequeñas partículas, las cuales podrían ser contaminantes introducidos en el proceso de manufacturación o haberse depositado en las etapas de esmerilado.

Luego de realizar el pulido químico usando una solución de HF/HNO₃ por 5 min a las muestras de los Grupos I, II y III, se pudo observar pequeñas regiones libres de huellas y con una mayor suavidad superficial (figura 2.10 (b), (d) y (f)). En todas las micrografías se observó el efecto de altiplano característico de este tipo de pulido. El cual se debe a que usualmente los cristales de un metal tienen distintas orientaciones, lo que provoca velocidades de ataque y disolución diferentes causando distintas profundidades. Según se observa, la superficie más plana, Grupo III, se encuentra menos atacada, lo cual se debería a que la misma posee una menor energía superficial antes de la inmersión en la solución ácida. El pulido químico puede eliminar grietas, huellas ásperas y suavizar las regiones situadas entre los límites de granos, pero según se observa en las micrografías genera también superficies con residuos lo cual fue reportado hace un par de años por Jarosz [145].

En la figura 2.11 se muestran las imágenes MEB de NT de TiO₂ fabricados sobre sustratos de Ti con distintos tipos de pulido (Grupo I, II y III) y en la figura 2.12 (a), (b) y (c) los resultados obtenidos del análisis del área de la sección interna, densidad y fracción de área ocupada por los NT de TiO₂ de cada grupo estudiado, respectivamente.

En todos los casos se aprecia que los nanotubos no presentan una forma perfectamente redondeada, lo cual es característico de las películas nanotubulares crecidas con las condiciones de anodización empleadas en este trabajo.

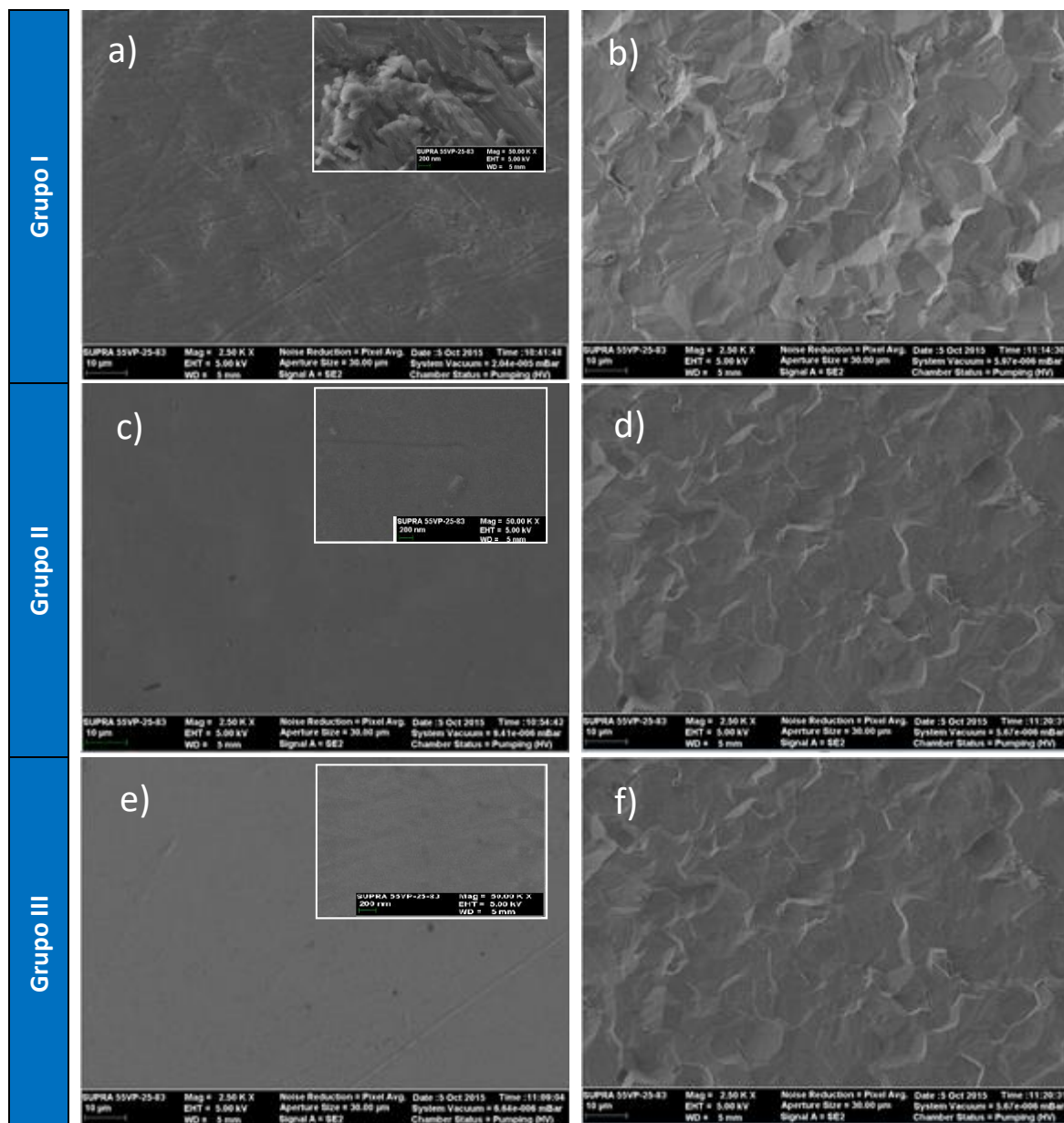


Figura 2. 10. Imágenes MEB de muestras de Ti con diferentes condiciones de pulido mecánico y respectivo pulido químico: (a) y (b) Grupo I, (c) y (d) Grupo II, (e) y (f) Grupo III. Magnificación 50 kX para las imágenes ubicadas en el borde superior derecho figuras (a), (c) y (e) y de 2,5 kX para las demás

En la muestra del Grupo I (figura 2.11 (a)) se observa que los tubos de mayor tamaño poseen una forma con tendencia poligonal mientras que los más pequeños son más redondeados. Los NT de TiO_2 crecidos en las muestras pertenecientes a los Grupos II y III, figura 2.11 (b) y (c) respectivamente, presentan un tamaño menos variable y una forma más redondeada que los obtenidos en la del Grupo I. Además, se observaron pequeños residuos de óxido sobre y entre los tubos.

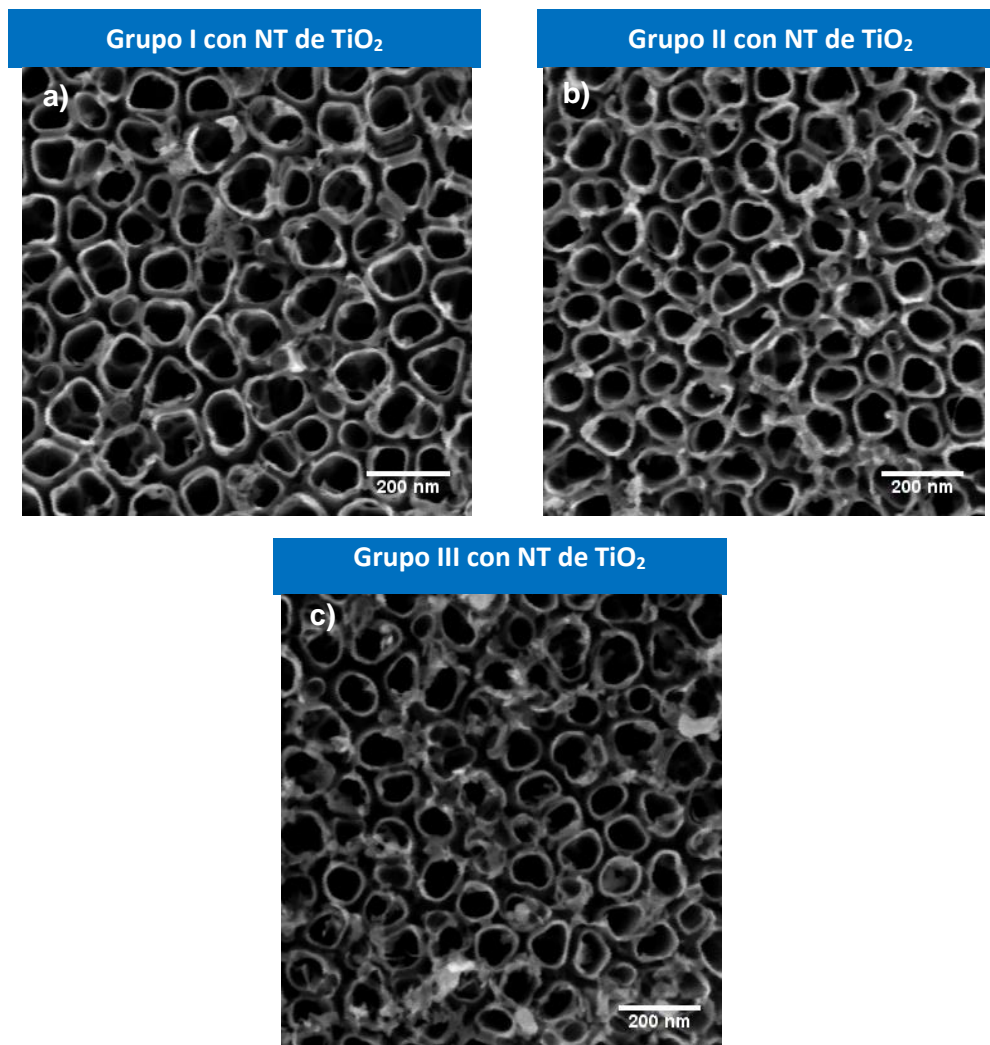


Figura 2. 11. Imágenes MEB de NT de TiO₂ fabricados en sustratos de Ti con distintos tipos de pulido inicial: (a) Grupo I, (b) Grupo II y (c) Grupo III

Las muestras del Grupo I presentaron una menor densidad de NT de TiO₂ y una mayor fracción de área ocupada, lo cual se relaciona directamente con una mayor área interna y mayor diámetro. Para los grupos II y III, en general no se observaron diferencia significativa entre ellos para ninguno de los casos. Si se analiza el gráfico 2.12 (b), si bien los resultados de porcentaje de área cubierta son similares entre ellos, existe una cierta tendencia que cuando el tamaño de la partícula abrasiva es más chico, el área cubierta es menor, lo que podría estar relacionado directamente con el espesor de la pared de los nanotubos. Por último, los tubos crecidos en los sustratos con menor rugosidad presentaron un mayor espacio intertubular.

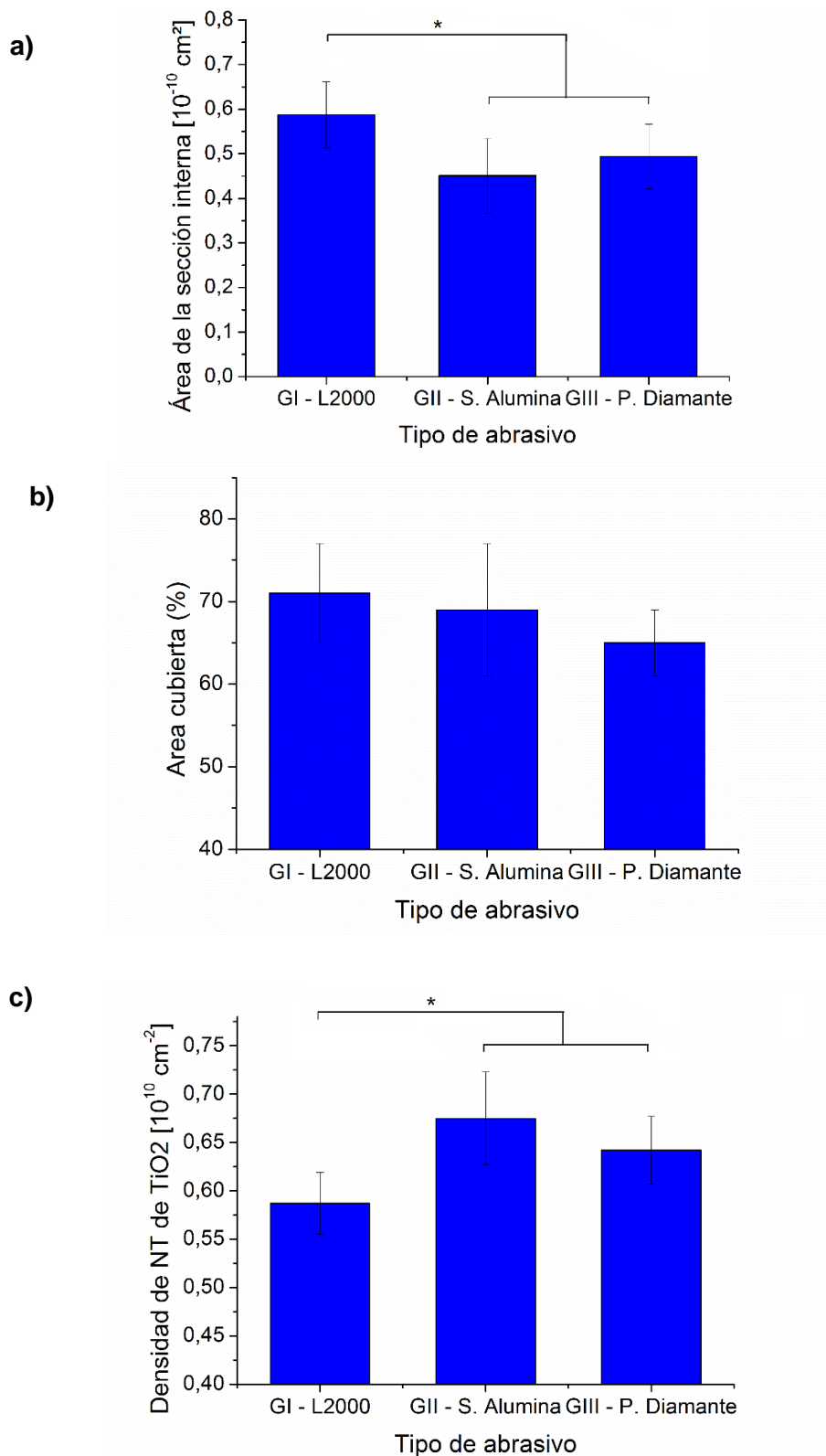


Figura 2. 12.Efecto del pulido previo al anodizado. Influencia del tipo de abrasivo usado en (a) área de la sección interna (las barras de error se corresponden con el desvío estándar), (b) fracción de área ocupada y (c) densidad de NT de TiO_2 . (*) Indica resultados estadísticamente diferentes con un nivel de significancia de 0,05

Métodos de limpieza de la superficie con NT de TiO_2

- Efecto de la solución de pulido químico

Las muestras del Grupo IV fueron anodizadas electroquímicamente siguiendo los pasos previamente descriptos usando una solución de pulido químico común (tal como lo indica el procedimiento en la literatura) por 5 min. La figura 2.13(a) permite ver la presencia de nanopartículas de color blanco distribuidas al azar y en algunos casos en forma de aglomerados en la superficie. Se observó, también, que la cantidad de éstas aumentaba a medida que se incrementaba el número de electrodos decapados en dicha solución. En la figura 2.13 (b) se observa las micrografías de una muestra del Grupo V, en la cual se utilizó solución fresca de pulido química para realizar el decapado y luego se procedió con los demás pasos del anodizado electroquímico. En ella se aprecia una superficie libre de partículas, pero aún con residuos entre los tubos producto del anodizado.

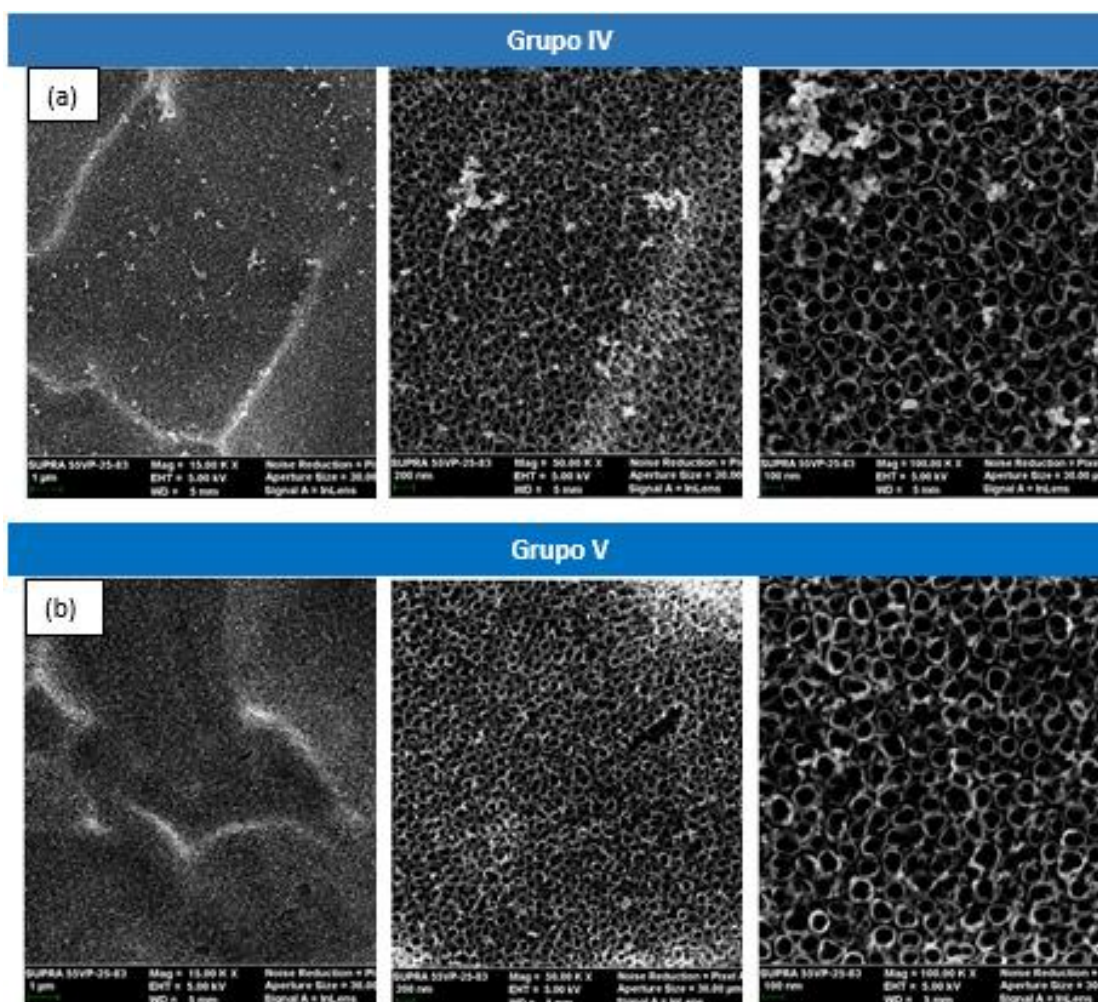


Figura 2. 13. Imágenes MEB de muestras (a) Grupo IV y (b) Grupo V. De izquierda a derecha: magnificaciones 15kX, 50kX y 100kX

Según Jarosz [145], el pulido químico del titanio en una solución de HF (40% en peso) y HNO_3 (65% en peso), 1:3 en volumen durante 10seg deja una superficie con residuos, que en nuestro caso podrían ser las causantes de los aglomerados sobre los nanotubos. Además, se demostró

que, utilizando una solución fresca de pulido, este tipo de depósitos disminuye considerablemente.

- *Limpieza por ultrasonidos*

En las figuras 2.14 y 2.15 se muestran los resultados obtenidos luego de sonicar a diferentes tiempos, en agua destilada, las muestras con NT de TiO_2 .

En la superficie de la muestra sin sonicar, Grupo VI figura 2.14(a), se observan partículas de tamaño nanométrico, distribuidas al azar, que en algunos casos se aglomeran; además de precipitados sobre y entre los tubos. Las muestras del Grupo VII, sonicadas por 2 s, resultaron con una superficie libre de aglomerados, y con muy pocos precipitados sobre y entre los tubos, ver figura 2.14(b), además de presentar desprendimientos de la capa nanotubular en los bordes de la muestra. Las muestras sonicadas durante 30 seg, Grupo VIII, mostraron desprendimientos en los bordes como así también en el centro.

En la figura 2.14(c), se observa claramente en una de las micrografías la capa barrera de TiO_2 con las huellas de la base de los NT, la cual queda como evidencia del desprendimiento de los nanotubos. La capa nanotubular no desprendida resultó libre de nanopartículas y precipitados, con tubos bien definidos. Las muestras sometidas a baño ultrasónico durante 2 y 5 min, Grupo IX y X respectivamente (figura 2.15 (a) y (b)), muestran grandes desprendimientos de la capa anódica, llegando este a ser completo en el caso de la de mayor tiempo de sonicado. Para estos casos no se evaluó morfológicamente con MEB las muestras, ya que el daño superficial producido a nivel macroscópico fue considerable.

Para todos los casos, se realizó un análisis composicional mediante EDS, el cual mostró los elementos químicos presentes en las capas superficiales de las muestras. Los resultados de EDS llevados a cabo en las muestras con y sin precipitados en la superficie muestran un contenido de oxígeno, titanio, flúor y cerio en ambos casos, por lo que estos podrían ser restos de óxido de titanio (Ti^{4+}) productos del proceso, tal como lo indican otros investigadores. Aunque no puede omitirse también el hecho de que la cantidad de los mismos no sería suficiente como para que la técnica los detecte [126], [171], [172].

El uso del baño ultrasónico resulta particularmente efectivo en la limpieza de sustratos con cavidades, agujeros y huecos y ha sido reportada por algunos autores como un método eficaz para la limpieza de superficies nanotubulares de TiO_2 obtenidas por método anódico. Tal es el caso de Xu y colaboradores [173], quienes utilizaron un baño ultrasónico (40 kHz, 80W) y agua para limpiar la capa nanotubular luego de la anodización. Los resultados experimentales que obtuvieron mostraron que los precipitados en la superficie de los nanotubos podían ser eliminados mediante este método, siendo el tiempo óptimo de sonicado de 9 min para los NT de TiO_2 obtenidos en esa condición experimental (diámetro promedio de 70 a 90 nm) y espesor de pared de 10 a 20 nm). Reportaron, además, que para tiempos mayores la capa se rompe y algunos nanotubos resultan seriamente dañados y desprendidos completamente del sustrato de Ti. En esta experiencia, los resultados muestran que, si bien se eliminan estos restos, la capa anódica resulta desprendida del sustrato en mayor medida, conforme aumenta el tiempo empleado. Evidentemente, para la limpieza superficial de los NT de TiO_2 obtenidos en esta investigación sería necesario utilizar un equipo con una mayor frecuencia ultrasónica, que produciría un menor tamaño del punto de cavitación en el interior del líquido lo que además permitiría llegar a lugares aún más pequeños de la superficie. Está claro que un punto de

cavitación más pequeño necesita menos energía para implosionar y también menor será la energía que va a entregar.

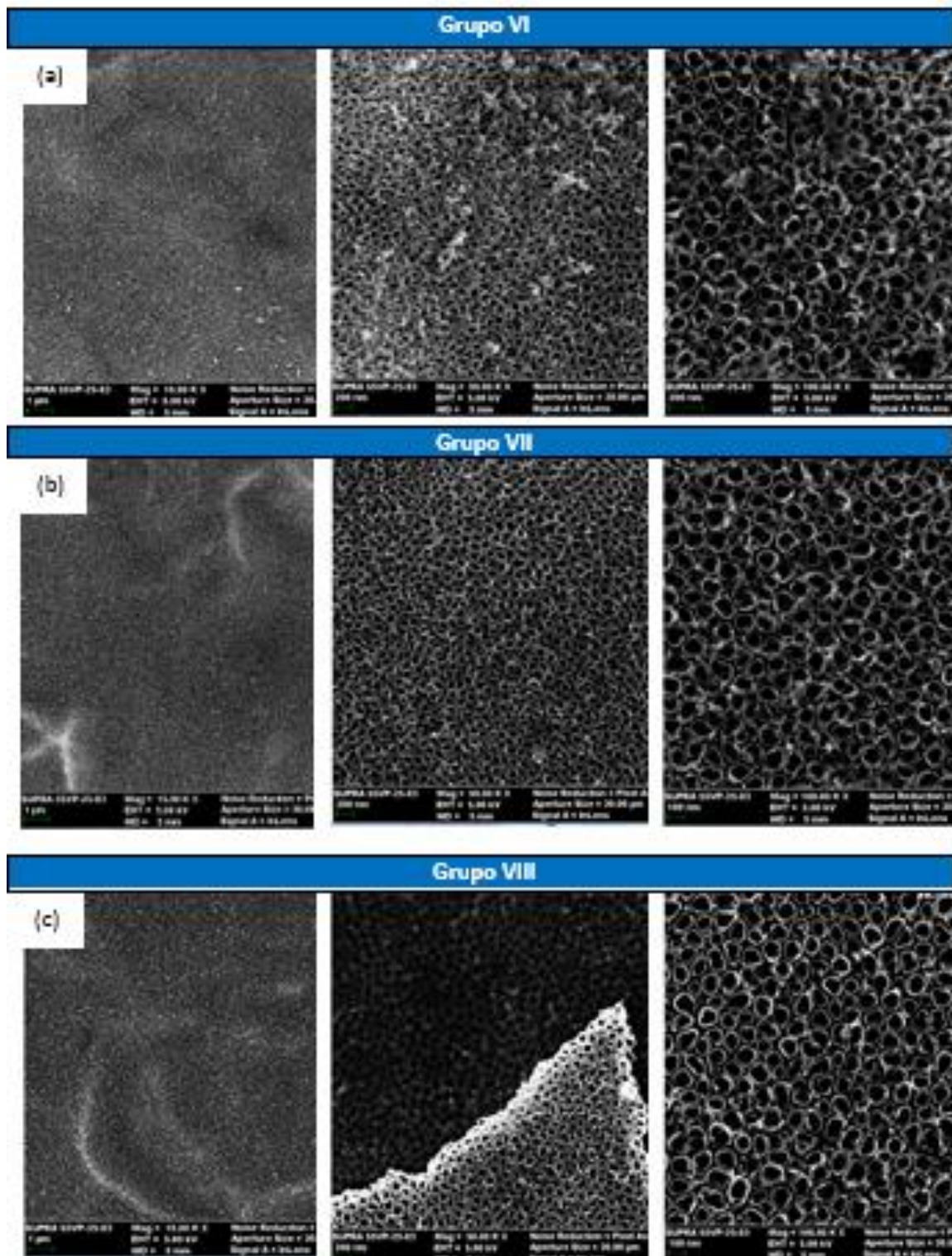


Figura 2. 14. Micrografías MEB de muestras sonicadas a distintos tiempos: (a) Grupo VI, (b) Grupo VII, (c) Grupo VIII. De izquierda a derecha, magnificación 15kX, 50kX y 100kX

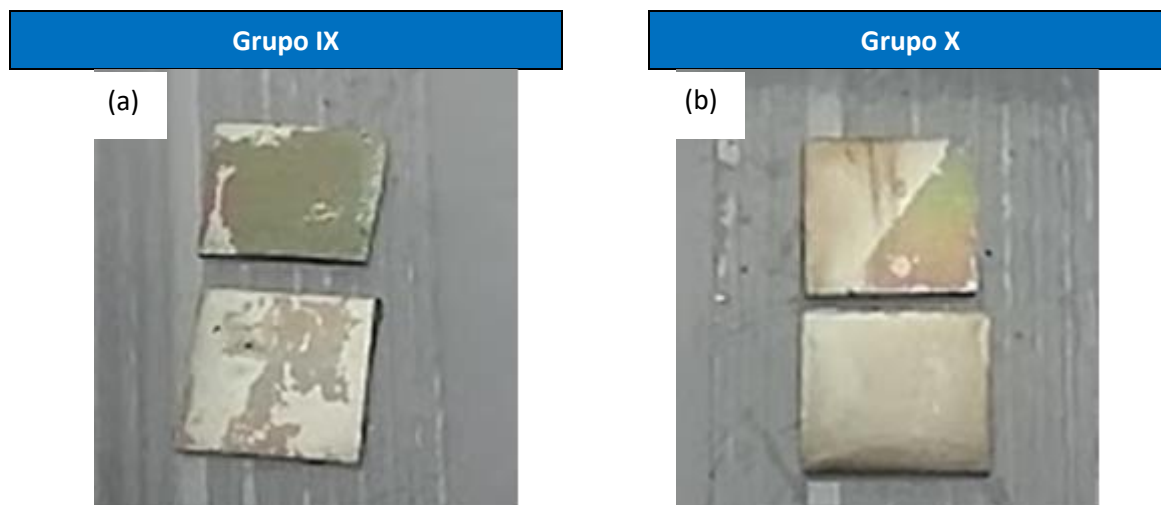


Figura 2. 15. Fotografías de muestras sonicadas a distintos tiempos: (a) Grupo IX y (b) Grupo X. Claramente se puede observar el desprendimiento en gran parte de la muestra de la capa de óxido

Otro punto por considerar sería qué sustancia se utiliza en la limpieza, ya que, para tener la mayor eficiencia de cavitación, ésta debe ser una solución acuosa con alta presión de vapor, con una baja tensión superficial y con condiciones de temperatura ya que la intensidad de cavitación aumenta al aumentar la temperatura y desaparece completamente a la temperatura de ebullición del líquido utilizado. Esto fue estudiado por Lai y Sreekantan [171], quienes utilizaron un baño ultrasónico con las mismas características (40 kHz, 150 W) pero con distintas soluciones de limpieza, agua destilada a temperatura ambiente, agua destilada a 90°C y una combinada con acetona. Al utilizar las dos condiciones descritas primero, durante 1min, obtuvieron microgrietas en la capa anódica y nanotubos aglomerados. Con la solución de acetona la sobre-capa que cubría los nanotubos se redujo al mínimo para 1 y 2 minutos y el aspecto geométrico de los NT (longitud media de 7,5 μm y un diámetro de aproximadamente 90 nm) se mantuvo, mientras que para 10 min de agitación ultrasónica la longitud de los nanotubos fue más corta. Resultados que podrían atribuirse, a que la acetona es un disolvente y presenta una menor tensión superficial que el agua destilada.

- Limpieza con solución de HCl 0, 1M

En la figura 2.16 (a) se presenta una muestra sin este tratamiento, grupo control, mientras que en la figura 2.16 (b) se pueden apreciar los resultados obtenidos luego de aplicar el protocolo de limpieza en solución de HCl 0,1M por 1 h. Las micrografías muestran que el método implementado eliminó considerablemente los depósitos y las impurezas, sobre y entre los nanotubos, resultando estos claramente definidos.

Algunos autores han informado tratamientos con soluciones ácidas luego del anodizado para eliminar la capa de precipitados de la superficie de los nanotubos, entre ellos podemos citar los realizados con ácido fluorhídrico (HF) y ácido clorhídrico (HCl). Si bien la solución de HF es extremadamente corrosiva, se ha reportado que resulta un método eficaz en la eliminación de los depósitos, pero presenta el inconveniente de que los nanotubos pueden resultar con bordes dentados y con texturas irregulares [172], [174]. Además, según informan [171], la utilización de esta solución (2% HF) produce nanotubos con una menor longitud luego de 20 segundos. Por otro lado [160] han utilizado con el mismo fin una solución con HCl 0,1M

obteniendo resultados óptimos, pero no informaron sobre el efecto de esta sobre los parámetros geométricos de los nanotubos. Otro dato importante de mencionar es, según la bibliografía consultada [175], [176], que el titanio sería resistente a la corrosión con HCl diluido a temperatura ambiente debido al fenómeno de pasivación que sufre.

Efecto del tratamiento térmico en la estructura nanotubular

En la figura 2.17 (a), (b) y (c) se muestran el aspecto superficial a nivel macroscópico de las muestras sin tratamiento térmico (Grupo XIII) y las recocidas a 450°C (Grupo XIV) y 650°C (Grupo XV), respectivamente. En ella se puede observar que luego del tratamiento térmico el color fue cambiando gradualmente, desde el púrpura con tonos verdes y grises para la superficie de la muestra del Grupo XIII a gris verdoso oscuro con zonas tornasoladas para la del Grupo XIV y la combinación de gris claro con negro para la del Grupo XV, conforme aumentaba la temperatura del tratamiento térmico. Las micrografías, obtenidas con el microscopio metalográfico, figura 2.18 (a), (b), (c) muestran con mayor detalle las superficies descritas anteriormente, revelando además que la muestra del Grupo XV no presenta un óxido homogéneo, figura 2.18 (c).

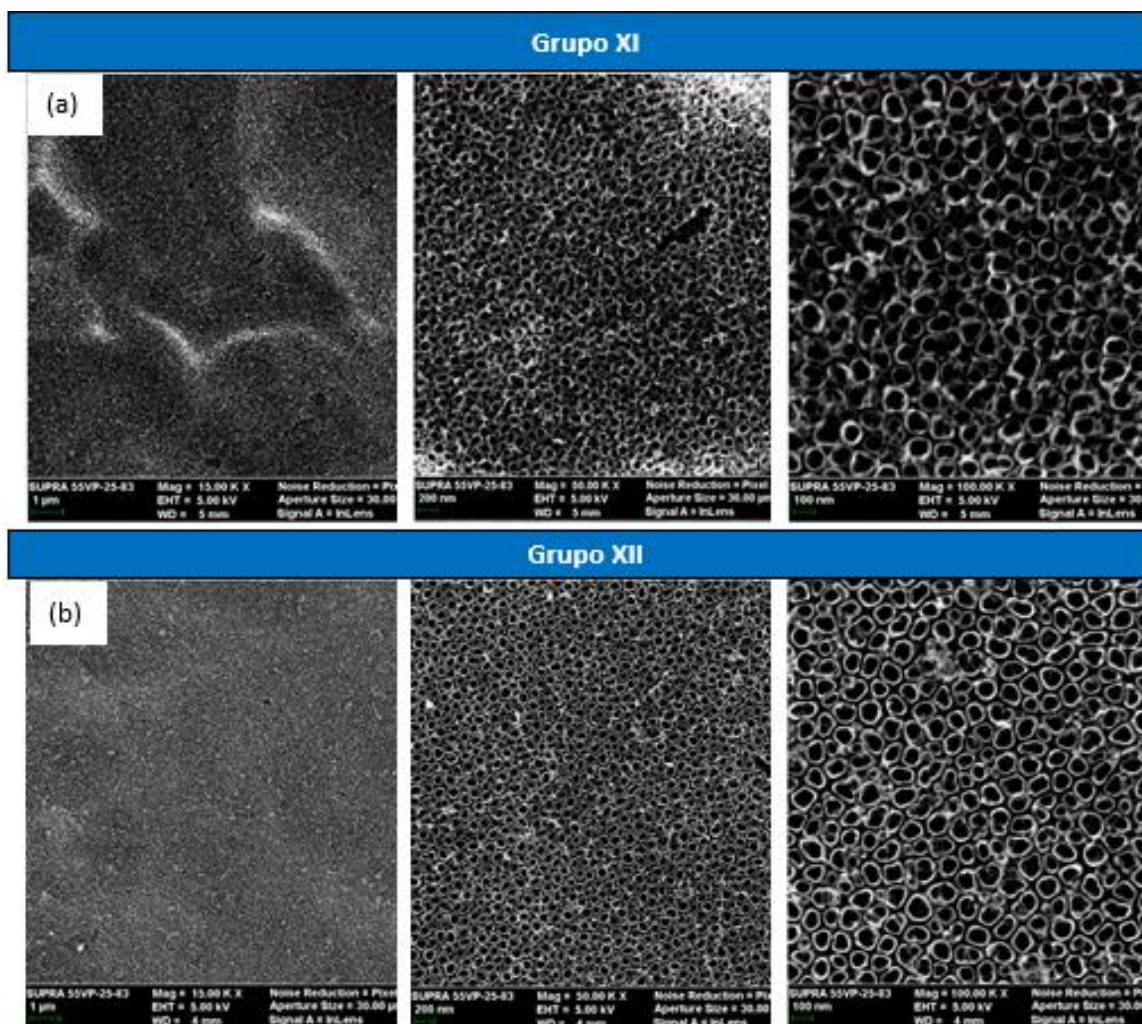


Figura 2. 16. Imágenes MEB de muestras sin (Grupo XI) y con (Grupo XII) el protocolo de limpieza en solución 0,1 M de HCl, (a) y (b) respectivamente. De izquierda a derecha: magnificación 15kX, 50kX y 100kX

Se ha reportado que el espesor de la capa de óxido depende del tamaño de grano del titanio [177] y del voltaje aplicado en el proceso de anodizado, siendo esta última una relación lineal con una constante de proporcionalidad entre 1,5 y 3,0 nmV⁻¹ [156]. Se sabe también que macroscópicamente, luego del anodizado la muestra cambia de color y de acuerdo con el color es posible determinar el espesor de la capa de óxido formada [156]. Teniendo en cuenta la escala de colores de interferencia estudiada en función de los espesores de la capa de óxido, y considerando que nuestra muestra anodizada a 20 V presenta un color grisáceo con tonos de púrpura y verdes, tal cual se describió anteriormente (figura 2.17 (a)), se puede estimar que el espesor de óxido de la muestra sin tratamiento térmico se encuentra en el rango de 150-210 nm. Cada espesor presenta un color de interferencia característico para cada voltaje, el obtenido en este trabajo coincide con los reportados en otros [61], [157].

Velten y colaboradores [156] utilizaron Ti c.p. grado 2 para producir recubrimientos por oxidación térmica en atmósfera de aire a diferentes temperaturas y determinaron el espesor de las películas con un elipsómetro espectroscópico de ángulo variable. Encontraron que, en el proceso de oxidación térmica, el espesor es función de la temperatura y del tiempo, con una tasa de crecimiento que se incrementa con la temperatura. Demostraron que hasta 500°C la tasa de crecimiento es logarítmica mientras que para 600°C parabólica. Además, indicaron que por encima de 80 nm de espesor no se puede observar ninguna relación entre el color y el grosor debido a la oxidación no uniforme de los granos de fase α que se encuentran en diferentes orientaciones, lo cual concuerda con las muestras obtenidas en esta investigación a 650 °C. Sin embargo, también confeccionaron una gráfica que relaciona el espesor de la capa de óxido luego de una oxidación térmica a 450°C en función del tiempo. La misma sugiere que de acuerdo con los parámetros utilizados para el grupo XIV (450°C, 180 min) nuestra capa de óxido tendría un espesor de 40 nm. Esto no concuerda con nuestros resultados observados ver figura 2.19, donde la capa de óxido, y por lo tanto la longitud de los NT de TiO₂, posee un valor de 224±18 nm, similar a lo reportado por Gong [131]. La principal razón podría ser que en esta tesis la formación de la capa de óxido fue obtenida por medio de un anodizado electroquímico en una solución de HF y el proceso térmico fue posterior al mismo. No obstante, los colores de una capa de óxido de espesor aproximado 180 nm, reportado por Velten previamente, coinciden con nuestros hallazgos y otros de la literatura [131], [156]. La figura 2.19 muestra las microfotografías de una muestra anodizada en 0,5% de HF y 20V, la cual posteriormente fue tratada térmicamente a 450°C por 3 h (Grupo XIV). La capa de NT despegada del sustrato permite observar la longitud de los nanotubos formados como así también la base de los mismos. Se puede observar que los NT son estructuras abiertas en la parte superior y cerradas en su parte inferior presentando en su base una estructura tipo domo la cual conformaría la llamada capa barrera, descrita en el capítulo 1 y que consiste en una película que separa la capa de óxido porosa del sustrato metálico. Para la misma muestra se realizaron mediciones de la longitud de los NT en condiciones de pre y post tratamiento térmico de 450°C el tratamiento térmico observándose que dicho tratamiento no influye en la longitud de los nanotubos.

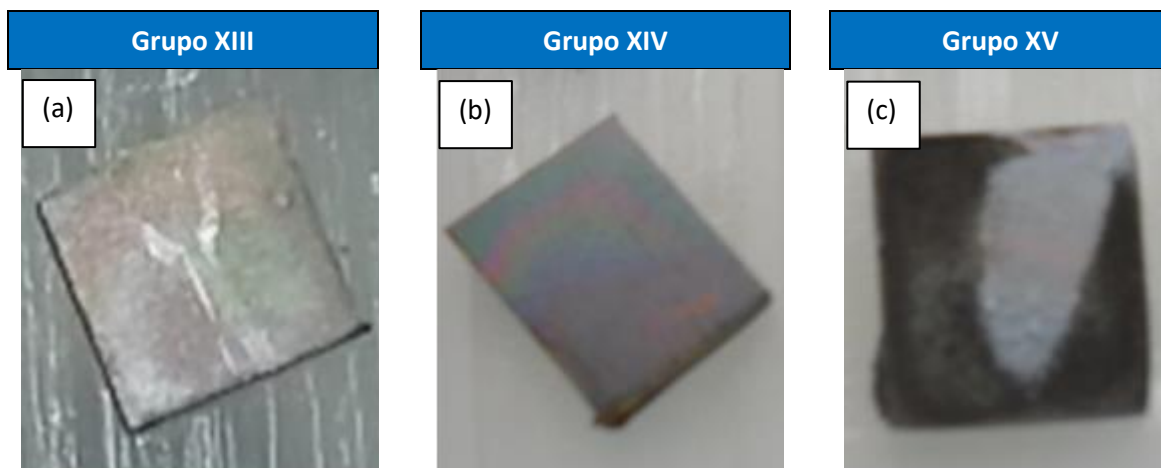


Figura 2. 17. Fotografías de muestras anodizadas (a) sin tratamiento térmico-Grupo XIII y con tratamiento térmico a (b) 450°C-Grupo XIV y (c) 650°C-Grupo XV

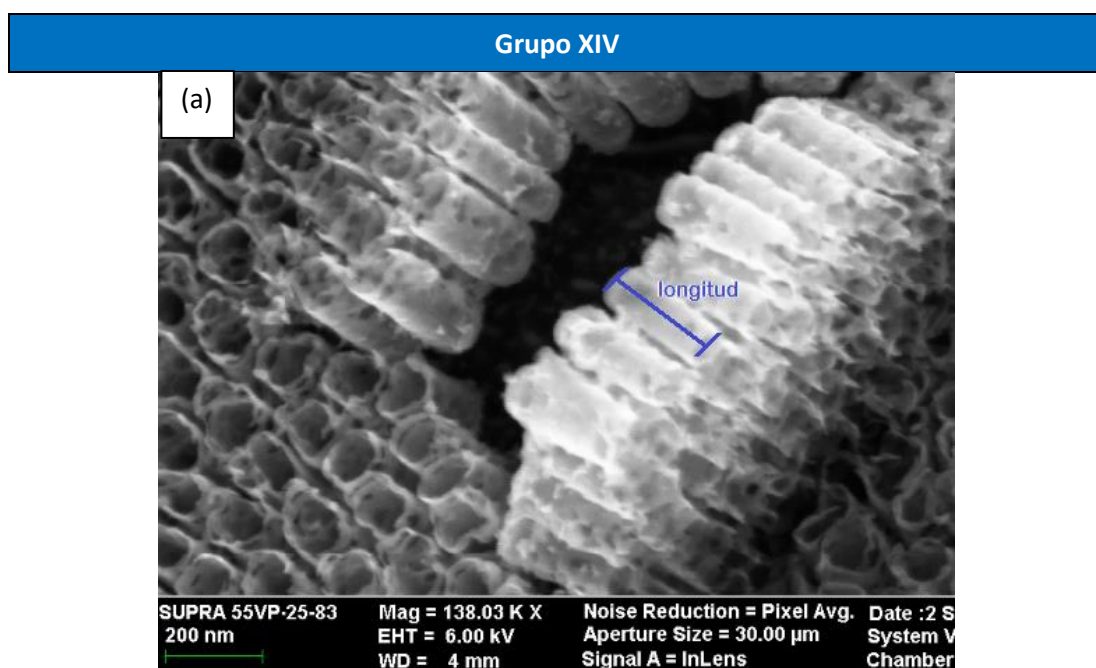


Figura 2. 18. Micrografías ópticas de muestras anodizadas (a) sin recocido Grupo XIII, (b) con recocido a 450°C-Grupo XIV y (c) a 650°C-Grupo XV. De izquierda a derecha: magnificación 12,5X, 25X y 50X

La figura 2.20 muestra las micrografías MEB obtenidas para NT de TiO_2 sin tratamiento térmico (Grupo XIII) y recocidos a temperaturas de 450°C (Grupo XIV) y 650°C (Grupo XV) en atmósfera de aire durante 3 h. En la muestra del Grupo XIV, figura 2.20 (b), se observó una superficie uniforme con características tubulares similares a la de la muestra sin tratamiento térmico, Grupo XIII figura 2.20 (a). Este resultado indica que los NT de TiO_2 fabricados tienen una excelente estabilidad térmica.

Los resultados obtenidos al someter la muestra a un tratamiento térmico de 650 °C se observan en la figura 2.20 (c), en ella se aprecia que la superficie se agrietó y que las paredes de los nanotubos colapsaron, aunque aún presenta porosidad. Estos resultados coinciden con los reportados por [178] quienes recocieron la película de NT de TiO_2 a 500°C durante 3h en una atmósfera de oxígeno y denominaron al aspecto obtenido como “patrón tipo gusano” (*wormlike pattern*). Lim y colaboradores obtuvieron resultados similares con un tratamiento en atmósfera de aire a 700 °C durante 2 h [154]. Las distintas temperaturas a las que se observa el mismo fenómeno es atribuible en primer lugar a las distintas condiciones atmosféricas en las que se lleva a cabo el tratamiento, en una atmósfera de oxígeno la oxidación térmica se produce mucho antes que en una de aire [157]; y en segundo lugar a las características morfológicas del recubrimiento. Lim sugieren que la longitud de los NT de TiO_2 no es el único factor crítico en el proceso de transformación de fase sino también lo es el estado electroquímico (composición del electrolito y el tiempo de anodización) utilizado en la síntesis de los NT de TiO_2 [154].

Según la bibliografía consultada [141], [154], [155], [179] los NT de TiO_2 cortos calcinados entre 300-500°C no presentan cambios discernibles en el diámetro, grosor de la pared y en el orden superficial, lo cual concuerda con las muestras del Grupo XIV obtenidas en este trabajo. Asimismo, aseveran que recién a partir de 500-600°C, se espera un aumento en el espesor de la pared acompañado de una disminución de la longitud y el diámetro del tubo.



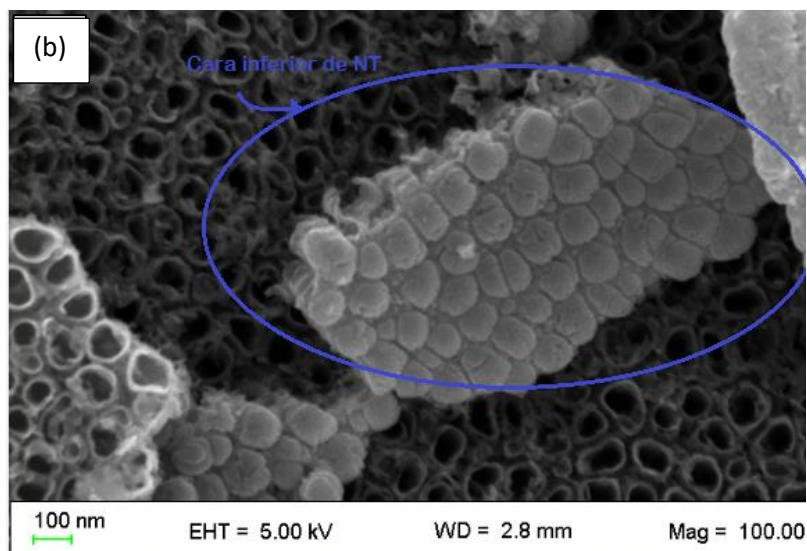


Figura 2. 19. NT de TiO_2 anodizados a 0,5% de HF, 20V, por 10 minutos y posterior tratamiento térmico a 450°C por 3 h. La figura (a) muestra la cara lateral de un bloque de NT con longitud $224\pm 18\text{ nm}$ y (b) muestra la cara inferior de los NT en forma de domo

El espesor de la pared aumenta debido al crecimiento de los cristalitos presentes en ellas. Además, sugieren que a partir de los 600°C la capa anódica comienza a deteriorarse y atribuyen este cambio a que los materiales nanoestructurados, que poseen una elevada área superficial y son generalmente metaestables, son más propensos a la sinterización en estado sólido a temperaturas más altas. Así mismo indican que a temperaturas que rondan entre los $700\text{-}800^\circ\text{C}$ la estructura nanotubular se destruye en gran medida y colapsa completamente.

En la figura 2.21 se ilustran los espectros Raman de las muestras con recubrimientos de titania sin tratamiento térmico y con recocido a 450°C y 650°C , Grupos XIII, XIV y XV respectivamente. Debido a las características superficiales de la muestra del Grupo XV (superficie con manchas oscuras) se presentan dos espectros a esta temperatura, discriminados como zona oscura y zona clara. En la tabla 2.11 se enumeran las desviaciones Raman cm^{-1} obtenidas para cada caso. Así mismo, en la tabla 2.12 se presenta una comparación de antecedentes bibliográficos de desviaciones Raman presentes en NT de TiO_2 crecidos en electrolitos ácidos y recocidos a distintas temperaturas en atmósfera de aire.

La muestra sin tratamiento térmico presentó picos en las posiciones 106, 96; 620,62 y $844,58\text{ cm}^{-1}$ los cuales según la bibliografía consultada (tabla 2.12) corresponden a una estructura amorfa. Además esto concuerda con lo reportado por otros autores [118], [150], quienes sugieren que la capa nanotubular de TiO_2 crecida a bajos potenciales de anodización y en electrolitos a base de agua es amorfa. Cabe aclarar que la intensidad de estos picos estuvo comprendida entre [19,41; 23,75] la cual, para algunos autores, es muy débil como para considerarse como tales. Por lo que en algunas publicaciones se reporta que para esta condición no existen picos definidos.

La muestra recocida a 450°C presentó picos en las posiciones de 143,99; 394,86; 514,75, y $635,69\text{ cm}^{-1}$. Según antecedentes bibliográficos (tabla 2.12) estos coinciden con los de la fase anatasa. Las mediciones fueron realizadas en distintos lugares de la misma muestra obteniéndose el mismo espectro en todos los casos.

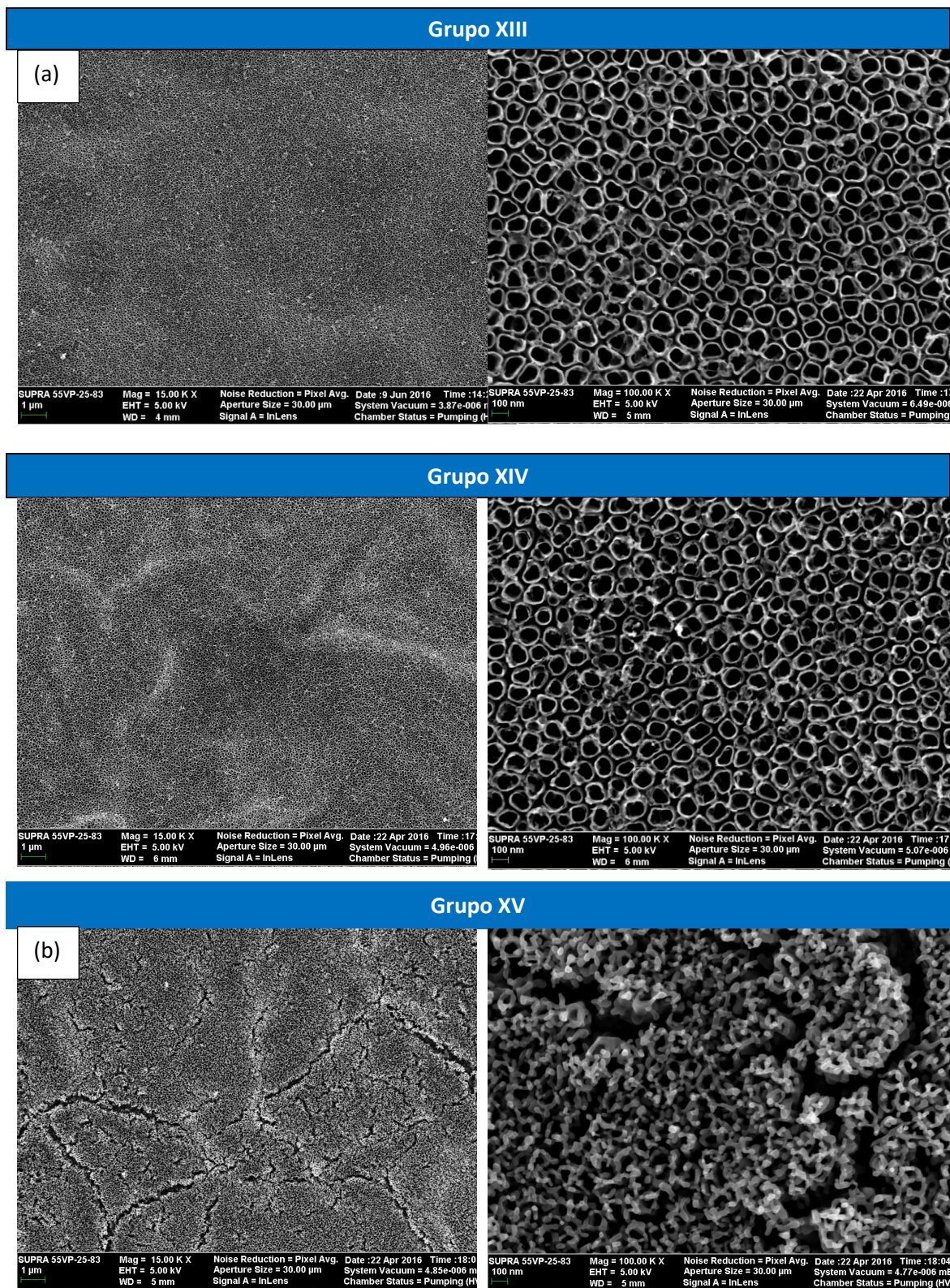


Figura 2. 20. Micrografías MEB para muestras (a) sin tratamiento térmico Grupo XIII y recocidas a (b) 450°C-Grupo XIV y a (c) 650°C-Grupo XV. Magnificación 15kX y 100kX, de izquierda a derecha

Esto indica claramente buena homogeneidad en toda la muestra. La muestra con tratamiento térmico a 650°C presentó dos espectros distintos según el lugar donde se realizó el disparo (figura 2.22), para la zona clara los picos se localizaron en 142,98; 238,19; 444,11 y 610,98 cm^{-1} que, según los antecedentes bibliográficos (tabla 2.12), se corresponden con la fase rutilo. Mientras que en la zona oscura se obtuvieron picos en las posiciones de 143,10; 230,89; 398,18; 448,98; 515,99 y 610,92 cm^{-1} los cuales revelan la existencia de la fase anatasa y rutilo en esa zona. Además, puede observarse en el espectro, figura 2.21(c), que los picos de rutilo son más intensos que los de anatasa. Estos resultados concuerdan con los reportados por [180] para nanotubos cortos, quienes obtuvieron una completa transformación a fase rutilo a 680 °C.

Se cree que cuando los NT de TiO_2 se someten a un tratamiento térmico, la cristalización de la estructura a fase anatasa tiene lugar tanto en las paredes de los NT de TiO_2 como en la región interfaz entre los nanotubos y el sustrato de Ti [180]. A medida que aumenta la temperatura los cristalitos de anatasa presentes en la interfaz se vuelven más grandes convirtiéndose en rutilo [181]. Mientras que en las paredes esta transformación se ve inhibida debido a las limitaciones impuestas por la mismas, quedando en ellas pequeños cristalitos de anatasa. Según lo informado por [76] esta restricción se mantiene hasta que se alcanza una temperatura en la que hay suficiente energía como para causar la ruptura de las paredes de los nanotubos y de este modo el colapso de la estructura y la formación de cristalitos de rutilo más grandes.

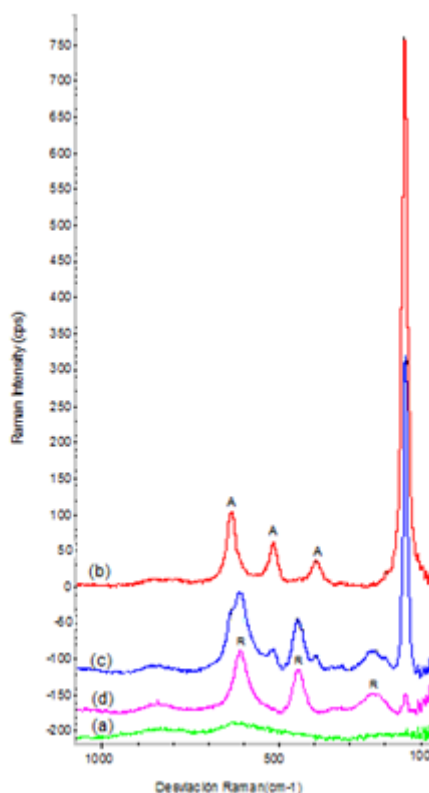


Figura 2. 21. Espectros Raman de recubrimientos de titania a) sin tratamiento térmico Grupo XIII, y con tratamiento térmico a (b) 450°C-Grupo XIV y 650°C-Grupo XV en zona oscura y zona clara, (c) y (d) respectivamente. A: picos de anatasa, R: picos de rutilo

Tabla 2. 11. Desviaciones Raman de muestras recocidas

Tipo de tratamiento	Desviaciones Raman (cm ⁻¹)				
Grupo XIII	106,96	620,62	844,58		
Grupo XIV	143,99	394,86	514,75	635,69	
Grupo XV (ZO)	143,10	230,89	398,18	448,98	515,99
Grupo XV (ZC)	142,98	238,19	444,11	610,92	

ZO: zona oscura, ZC: Zona clara. Desviaciones obtenidas con herramienta “buscador de picos” en la Región: 1000,00-100,00[cm⁻¹] y con una Sensibilidad: 71 y 14 (S/TT). Rango de intensidad de los picos: Grupo XI [19,418; 23,759]; Grupo XII [38,366; 715,057]; Grupo XIII_ZO [19,417 ; 432,145] y Grupo XIII_ZC [29,700;84,783]

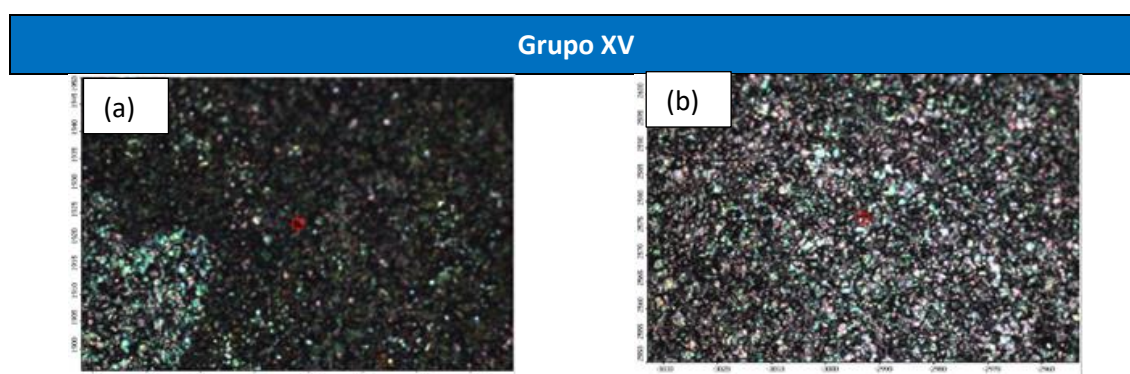


Figura 2. 22. Imágenes de las posiciones exactas donde se hizo incidir el láser sobre la muestra (puntero rojo), objetivo 10X: Muestra Grupo XV, zona oscura(a) y zona clara (b).

Tabla 2. 12. Comparación de antecedentes bibliográficos de desviaciones Raman presentes en NT de TiO₂ con recocido a distintas temperaturas en atmósfera de aire

Fases	AMORFO			ANATASA				RUTILO			
T[°C]	S/TT			400		450		600	650		800
Referencias	En este estudio	Ref [1]	Ref [2]	Ref [3]	Ref [2]	En este estudio	Ref [1]	Ref [1]	En este estudio		Ref [1]
									ZO	ZC	
Desviaciones Raman (cm ⁻¹)	106,96	TiO2 amorfa, no tiene picos definidos		152		143,99	144	La fase anatasa se transforma parcialmente a rutilo y comienzan a aparecer los picos típicos.	143,10	142,98	138
						196	230,89		238,19	230	
			454	394	397	394,86	387		398,18		
	620,62		617	503	514	514,75	514		448,98	444,11	443
	844,58		850-890	630	638	635,69	633		515,99		
					830				610,92	610,98	606

S/TT: Sin tratamiento térmico, ZO: Zona Oscura, ZC: Zona Clara

Efecto de la concentración de HF de la solución de trabajo en la formación de NT de TiO_2

La Figura 2.23 muestra las diferentes nanoestructuras obtenidas según la concentración de HF utilizada durante el proceso de anodizado. Se obtuvo una capa homogénea de nanotubos en toda la superficie del sustrato para las concentraciones de 0,5 y 0,82 % en peso de HF., figura 2.23 (b) y (c).

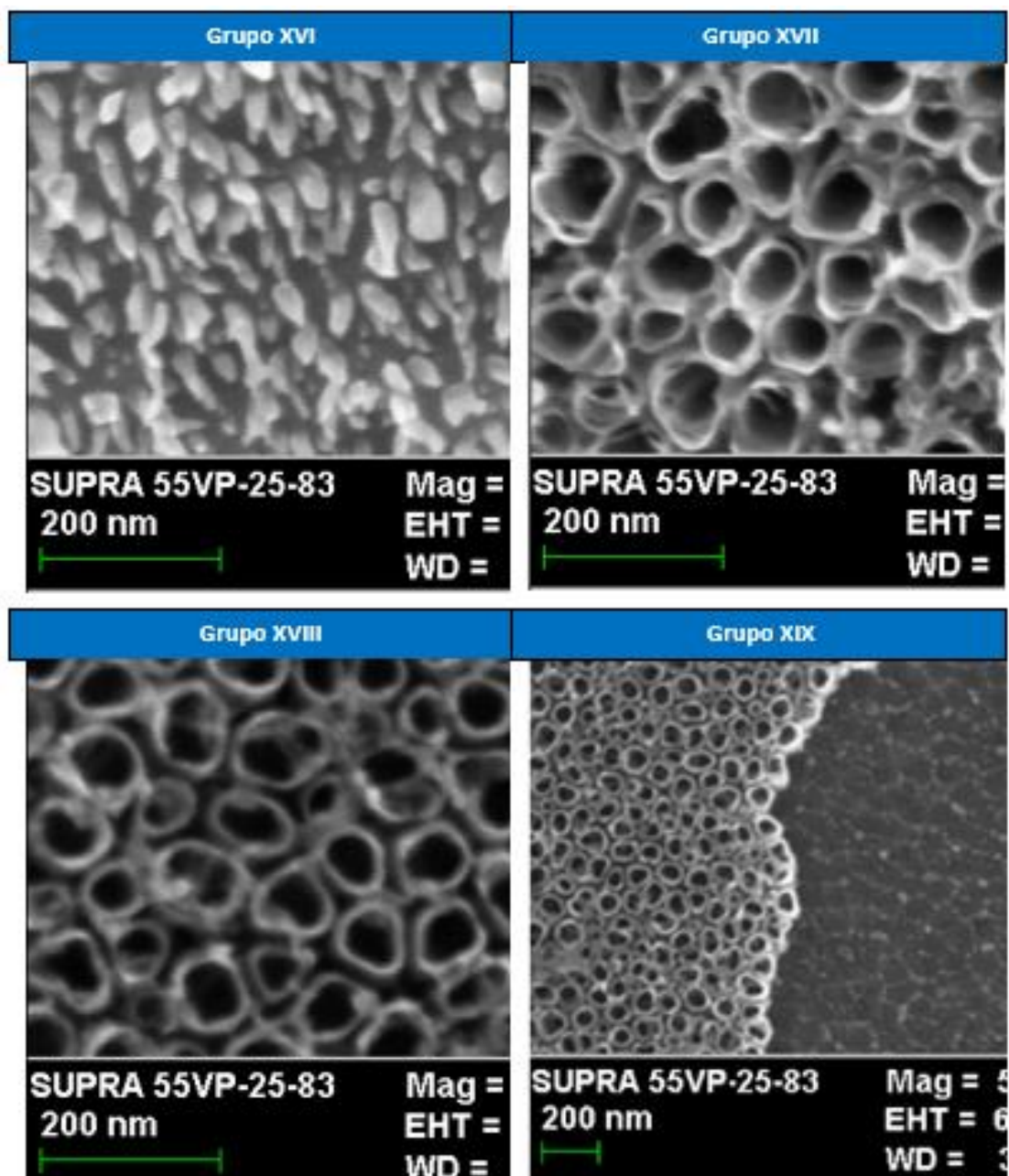


Figura 2. 23. Micrografías de las superficies de TiO_2 para muestras con distintas concentraciones de HF, (a) Grupo XVI: 0,3% de HF, (b) Grupo XVII: 0,5%HF, (c) Grupo XVIII: 0,82%HF y (d) Grupo XIX: 1% HF. Se observa formación homogénea de NT de TiO_2 en toda la superficie del sustrato para 0,5% y 0,82% de HF

Para la menor concentración estudiada, la cantidad de iones fluoruro disueltos en solución parece no haber sido suficiente para la correcta formación de nanotubos y solo se observaron estructuras en forma de bastones delimitados por huecos en toda la superficie de las muestras anodizadas a 0,3% de HF figura 2.23 (a). Este resultado podría estar reflejando el momento inicial en la formación de la capa nanotubular. Las etapas en la formación de la capa de NT fue explicada previamente por Venkatachalam en la anodización de sustratos de vidrio cubiertos primero con una delgada película de ITO y luego con una película de titanio mediante pulverización catódica [182]. Venkatachalam estudió la anodización electroquímica de los mencionados sustratos en una solución de trabajo de 1M H_2SO_4 +0,15 % en peso de HF a 10V a tres tiempos de anodizado, a saber, 30, 60 y 120 min [182]. Una topografía similar a nuestros resultados fue reportada para el menor tiempo estudiado. Venkatachalam explicó que la presencia de dichas estructuras, en la capa de TiO_2 corresponde al comienzo de la formación de NT, proponiendo así un esquema, como se muestra en la figura 2.24, donde presenta las etapas involucradas. En su caso, la formación incompleta de la NT a 30 min estaría relacionada con una baja concentración de iones F^- en la solución de trabajo, combinada con un tiempo de anodizado corto. Bajo estas condiciones él logró la completa formación de la capa nanotubular en 60 min.

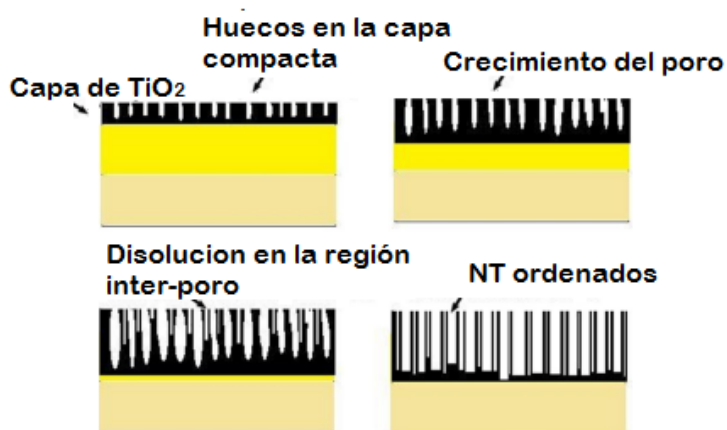


Figura 2. 24. Diagrama esquemático de las etapas de crecimiento de los NT de TiO_2 mediante anodizado. Adaptado de [182]

Para concentraciones de 1% de HF (Grupo XIX) se observó que la superficie presentaba regiones donde los nanotubos habían crecido perfectamente alternadas con regiones vacías, figura 2.23(d). Además, algunas zonas presentaban depósitos de óxido sobre los NT. Observando con profundidad las zonas donde los NT estaban ausentes, es posible ver un patrón similar a la abertura de los nanotubos marcado en la base del Ti; evidenciando que la capa de óxido se formó en una primera instancia pero posteriormente se despegó de la superficie del sustrato. Al examinar las muestras en el MEB no se observaron capas tubulares sueltas (no adheridas) sobre nuestro sustrato, razón por la cual se considera que el despegue de las mismas ocurrió durante el proceso de anodizado. Por lo que en general los sustratos anodizados a 1% en peso de HF presentan una superficie de crecimiento inhomogénea. Esto estaría causado porque la velocidad de corrosión de los NT de TiO_2 por parte del ion fluoruro presente en el electrolito es mayor que la tasa de crecimiento para soluciones de trabajo con concentraciones altas de HF.

En el caso donde los nanotubos se formaron exitosamente en toda la superficie del titanio se observó una mayor homogeneidad y organización para 0,5% (Grupo XVII) en peso de HF, razón por la cual se eligió esta concentración para los estudios posteriores.

La concentración de HF juega un papel fundamental en el control de la morfología superficial. El HF actúa como un agente de apertura de poros. Si la concentración de HF no es suficiente el sustrato de Ti solamente se pasiva (se cubre con una capa de óxido compacta). Además, para bajas concentraciones de HF en la solución de trabajo se necesitan mayores voltajes de anodizado para obtener estructuras tubulares [131]. Por otro lado, según Wang, si la concentración de HF es demasiado alta, los depósitos superiores del óxido se disolverán fácilmente llegando a deteriorar la estructura de los NT lo que resulta en numerosos defectos e incluso haciendo desaparecer la capa nanotubular [172].

De la literatura se sabe que concentraciones de HF mayores a 1 % en peso las nanoestructuras tubulares comienzan a unirse para formar una superficie porosa con paredes interconectadas [183], por ello, en la presente tesis solo se estudiaron concentraciones menores de manera de obtener nanoestructuras tubulares individuales.

Efecto del voltaje de anodizado en el diámetro de los NT de TiO₂

El siguiente parámetro evaluado fue el efecto del voltaje. Los parámetros de anodizado que permanecieron constantes fueron: uso de solución de decapado fresca para cada electrodo, concentración de la solución de trabajo de 0,5% en peso de HF y limpieza de los electrodos en solución 0,1M HCl.

La figura 2.25 muestra las microfotografías de los sustratos de NT de TiO₂ para los siguientes voltajes: 2,5V, 5V, 10V, 15V, 20V y 25V. Para el primer caso, Grupo XX: 2,5V no se observó ninguna formación de NT sobre la superficie del sustrato, solamente se pudieron reconocer algunas zonas que presentaban un cierto precipitado de forma cubica que podría estar relacionado a la formación y decantación de un cristal de sal proveniente del electrolito. La inexistencia en la formación de nanotubos en la superficie del sustrato para potenciales menores a 4V fue también reportada por Xin al estudiar la anodización de Ti en un electrolito mixto de HF/ácido acético con concentración de HF entre 0.3 y 0.9% en peso [184]. Para el Grupo XXI: 5V (figura 2.25 (b)) se observa la formación de NT en la superficie con un aspecto general de tipo esponja, donde los nanotubos están internamente conectados a través de paredes comunes con un diámetro típico de poro entre 15 y 30 nm; el mismo efecto fue reportado en la literatura para voltajes menores a 6V [131]. Para valores de voltaje entre 8-20 V se reportó que las paredes se separan y las estructuras se vuelven completamente individuales para formar tubos definidos, este efecto fue visto por Lewandowska [185] y coincide con lo observado en este trabajo. Nuestros resultados muestran que a medida que el voltaje se incrementa, estructuras cilíndricas, huecas y discretas comienzan a aparecer, ver figuras 2.25 (c), (d) y (e), las cuales corresponden a voltajes de anodizado de 10V (Grupo XXII), 15V (Grupo XXIII) y 20V (Grupo XXIV), respectivamente. En ellas se observa la formación de nanotubos individuales, orientados verticalmente y perfectamente definidos en toda la superficie y con sus bordes superiores suaves. Todas las muestras pertenecientes a estos grupos fueron muy homogéneas.

Para el último caso estudiado, Grupo XXV: 25V (figura 2.25 (f)) se observa también la formación de nanotubos en la superficie, pero las fotografías sugieren que algunos de los NT se fusionaron entre si uniéndose por las paredes. En general, la superficie presenta una estructura mayormente porosa y claramente se distingue una amplia variación en los

diámetros de las estructuras observándose poros de diámetros muy pequeños y muy grandes. A la vez, se observa un aspecto irregular en los bordes superiores de tipo angular y una característica común es la presencia de residuos de óxido en todas las muestras. Según Gong, la estructura tubular se pierde por completo para voltajes superiores a 40V y la misma es reemplazada por una estructura aleatoria porosa en forma de esponja [131]. Nuestros resultados sugieren que a partir de 25V se alcanza el límite indicado por Gong. Este podría deberse a alguno de los parámetros de anodizado utilizados como ser la temperatura del baño, la separación entre los electrodos o incluso la presencia o no de un agitador magnético.

La figura 2.26 muestra el comportamiento de los diámetros internos de los NT de TiO_2 en función del voltaje de anodizado. Se observa que los diámetros varían en un rango que va desde 15 a 100 nm para voltajes comprendidos entre 5 -25 V. Vale aclarar que el último punto de la gráfica a 25 V refleja el promedio de solo 100 mediciones (a diferencia de los demás promedios) de NT considerando que la muestras bajo estas condiciones no presentaron estructuras claramente definidas y la mayor parte de ellas se encontraba cubierta con residuos de óxidos.

Se observa en la gráfica que el diámetro de los NT posee una relación directamente proporcional con el voltaje; a mayor voltaje, mayor diámetro interno de los NT de TiO_2 . Se distingue, también, una relación lineal hasta los 15 V y a partir de allí se observa un rápido incremento en el diámetro de los NT versus el voltaje. Esto estaría en discrepancia con lo reportado mayormente en la literatura, ya que la mayoría de los estudios muestran una relación lineal del diámetro para todo este rango. Sin embargo un comportamiento similar fue reportado por Lewandowska en donde el rango lineal descrito en su trabajo fue observado para valores menores, entre 3-8 V [185].

Esto estaría relacionado con la competencia entre la tasa de disolución química del TiO_2 por parte de los iones fluoruro y la tasa de formación electroquímica, la cual incluye tanto la oxidación del Ti y el decapado inducido por campo eléctrico del TiO_2 [186], [187], sin embargo, el mecanismo no está completamente entendido todavía. Un aumento del voltaje está relacionado directamente con la tasa de decapado superficial y consecuentemente con la topografía y el diámetro de los nanotubos [188].

Se ha reportado que la relación de diámetros en función de la tensión aplicada depende del factor de crecimiento anódico f_g , que representa la migración de los iones dentro de la capa anódica y se expresa en nmV^{-1} , a través de una relación lineal detallada en la ecuación 5. Donde D_e corresponde al diámetro externo y V es el potencial de anodizado. Siendo el valor de oxidación electroquímica del Ti, $f_g = 2,5 \text{ nm/V}$

$$D_e = 2 * f_g * V \quad (5)$$

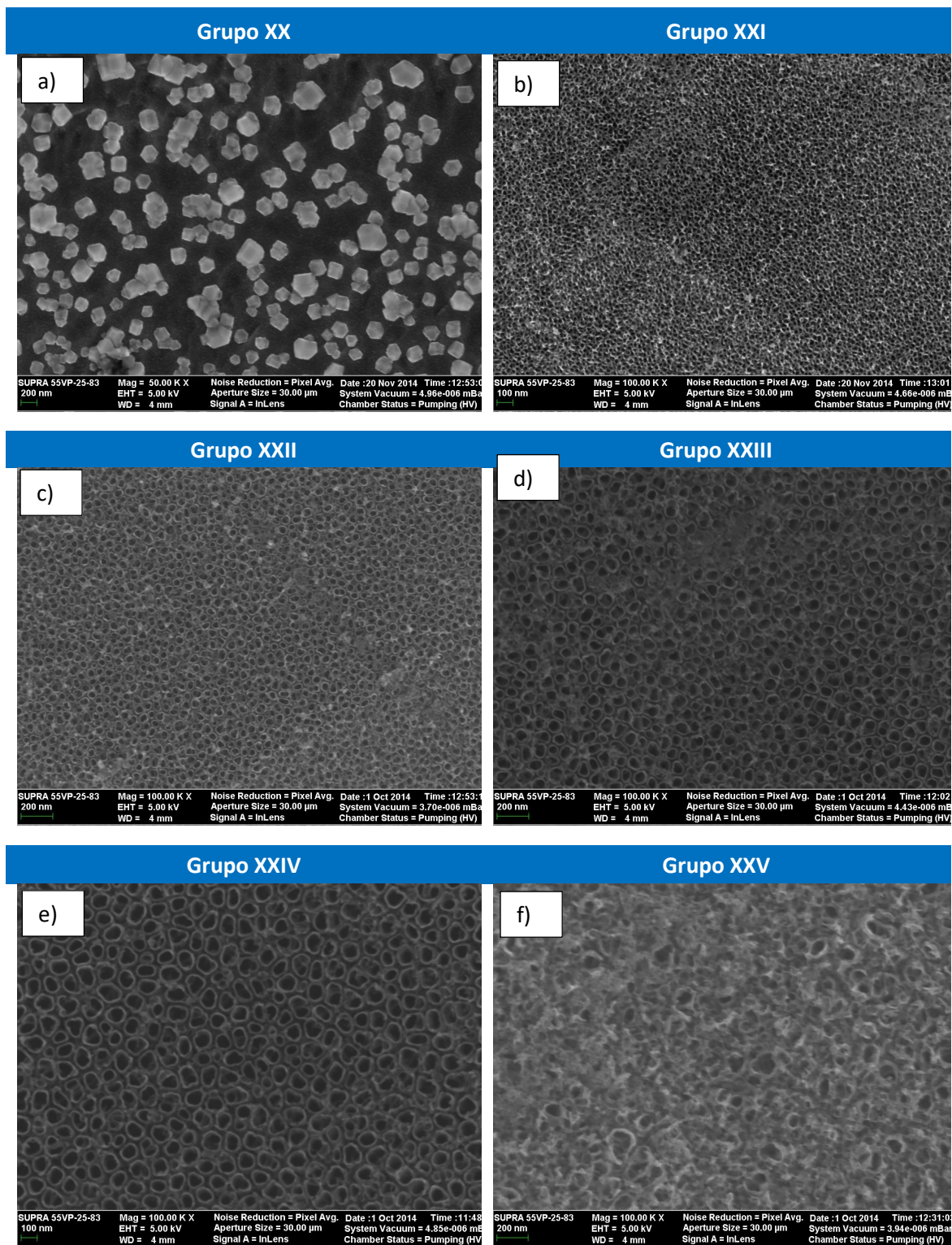


Figura 2. 25. Microfotografías de los nanotubos de TiO_2 y su variación con el voltaje de anodizado, a) Grupo XX: 2,5V, b) Grupo XXI: 5V, c) Grupo XXII: 10V, d) Grupo XXIII: 15V, e) Grupo XXIV: 20V y f) Grupo XXV: 25V. Parámetros de anodizados: 0,5% en peso de HF y 10 minutos

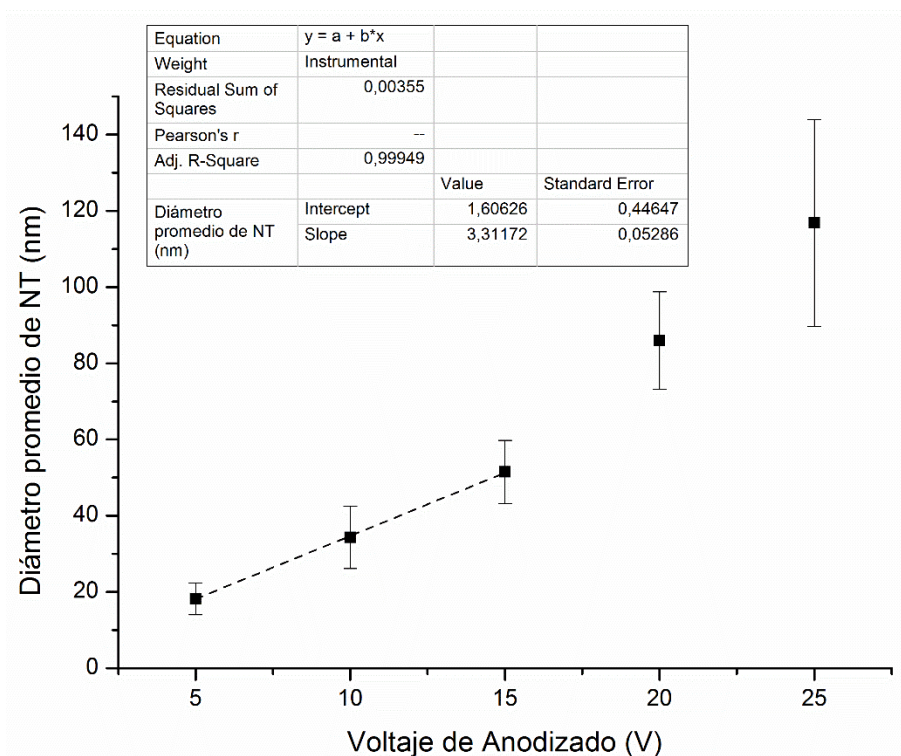


Figura 2. 26. Efecto del voltaje de anodizado en el diámetro de los NT de TiO_2 fabricados a 0,5% de HF por 10 minutos. Existe una relación directa entre ambos parámetros y una relación lineal solo para voltajes entre 5 y 15 V

La tabla 2.13 muestra la comparación de nuestros resultados experimentales con los resultados teóricos de la literatura [138], incluye además el porcentaje por el cual difieren del valor teórico.

Tabla 2. 13. Comparación entre los valores experimentales y teóricos del diámetro de los NT de TiO_2

Voltaje (V)	Diam. Experimental (nm)	Diam. Teórico (nm)	Diferencia entre ellos (%)
5	18,27	25	27
10	34,3	50	31
15	51,5	75	31
20	86	100	14
25	116	125	7,2

Si bien los datos no son exactamente iguales se observa en general que a mayor voltaje, mayor es el diámetro de los NT. A su vez la tendencia de crecimiento es similar para los primeros tres valores donde la diferencia entre los valores teóricos y prácticos corresponde aproximadamente a un 30%. Claramente esto confirma que existe una relación lineal entre el voltaje y el diámetro tal cual se observó anteriormente. Sin embargo, para los valores de tensión de 20 y 25 V la diferencia se hace menor lo que indica que el crecimiento del diámetro no es lineal, si no más rápido, confirmando lo visto en la figura 2.26. Hay que tener en cuenta que otro punto que aporta a la diferencia global de los valores es que el valor teórico se refiere

al diámetro externo lo cual incluye la medición del diámetro interno (al igual que en nuestros experimentos) más la pared de los NT.

El estudio composicional de las superficies nanoestructuradas de TiO_2 permitió corroborar, en todos los casos que la composición química de las muestras era muy similar, razón por la cual solo se muestra un espectro. La Figura 2.27 corresponde a la composición química de los nanotubos de TiO_2 anodizados a 20V y 0,5% en peso de HF por 10 minutos. Claramente se distinguen los picos de titanio y oxígeno con una fracción másica del Ti de 67% y del oxígeno de 28%, esto se debe a que una gran proporción de la señal de Ti proviene del sustrato. Se ha reportado en la literatura que el oxígeno de la superficie puede estar en la forma de TiO_2 o TiOH [189]. También se observa un pico de baja amplitud confirmando la presencia de flúor, el cual podría estar depositado como un elemento residual considerando que el ion fluoruro es parte del proceso químico de la formación de NT. Si y colaboradores sugieren que la presencia de F estaría relacionada a un pobre enjuague de la muestra dada su superficie porosa y mayor área superficial posterior al anodizado [190]. Según Hamlekhan la presencia de este ion en la superficie de las muestras anodizadas podría afectar potencialmente la hidrofiliidad de las muestras [189].

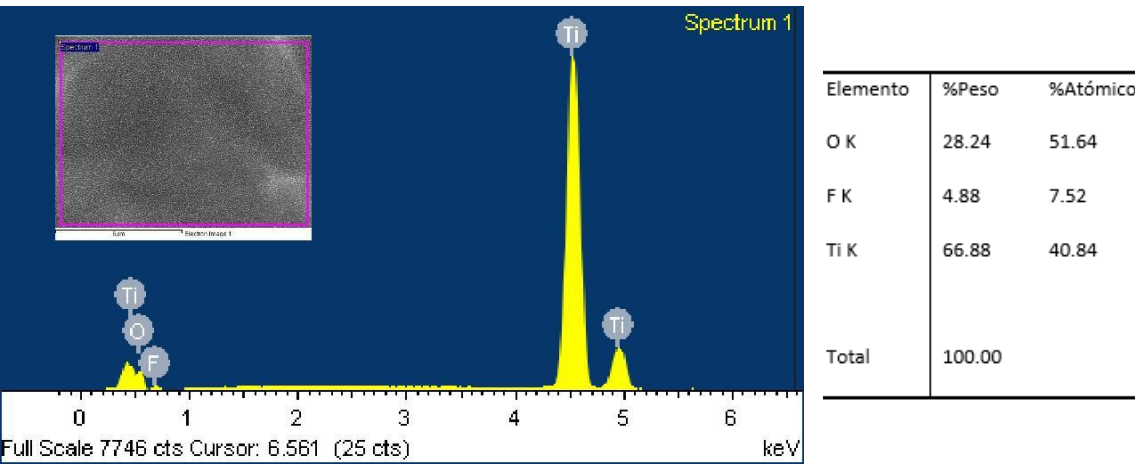


Figura 2. 27. Composición química de los nanotubos de TiO_2 anodizados a 20V, 0,5% en peso de HF por 10 minutos. El análisis de EDS confirma la presencia de titanio, oxígeno y flúor en la superficie de todas las muestras.

Formación de microcanales paralelos en la superficie de los sustratos de Ti previo a la formación de NT de TiO_2

Como ya se mencionó en el Capítulo 1 todos los implantes comercialmente disponibles poseen una rugosidad micrométrica que permite una mayor adhesión celular a la vez que aumenta la superficie efectiva disponible y mejora el anclaje al hueso. Razón por la cual se decidió realizar microcanales en la superficie de los sustratos de Ti.

En la sección previa se describió que el objetivo del pulido inicial hasta pasta de alumina de 0,3 μm es eliminar todo tipo de imperfecciones y lograr obtener superficies planas y homogéneas que se usarán de base para los ensayos. Para este ensayo, dichos sustratos fueron seguidamente sometidos a un pulido adicional con lijas de diferente granulometría para así lograr microcanales de diferentes tamaños de manera de obtener una microrugosidad en nuestros sustratos.

Mediante microscopia óptica se pudo hacer el seguimiento de toda la etapa de lijado corroborando que la superficie se encontrara uniformemente pulida antes de pasar a la siguiente lija. Esto fue un paso determinante al fabricar los microcanales ya que se requería que los mismos fueran paralelos entre sí. La figura 2.28 muestra tres imágenes ópticas de los microcanales obtenidos mediante lijado. Como se puede observar los mismo están dispuesto al azar y por ende, no resultan útiles para los ensayos posteriores (realizados en el Capítulo 3), esto fue debido a un pulido inicial base insuficiente.



Figura 2. 28. Fotografías de los microcanales tomadas con un microscopio metalográfico. Se puede apreciar un rayado superficial con diferentes direcciones lo que indica un mal proceso de lijado y pulido. Muestras de Ti pulido con (a) alúmina de 0,3 μm (aumento 10X), (b) lija de 180 (aumento de 10X) y (c) lija de 180 (aumento de 50X).

De aquí se puso especial énfasis en lograr una superficie “espejo” previo a la formación de los microcanales. La figura 2.29 muestra imágenes ópticas de sustratos de Ti con microcanales paralelos entre sí obtenidos luego de un lijado óptimo. Se puede ver claramente que ahora todas las marcas del pulido se encuentran en una sola dirección dejando un patrón superficial de surcos todos paralelos entre sí, logrando así nuestro objetivo de formar microcanales.

Grupo XXVI: Formación de microcanales

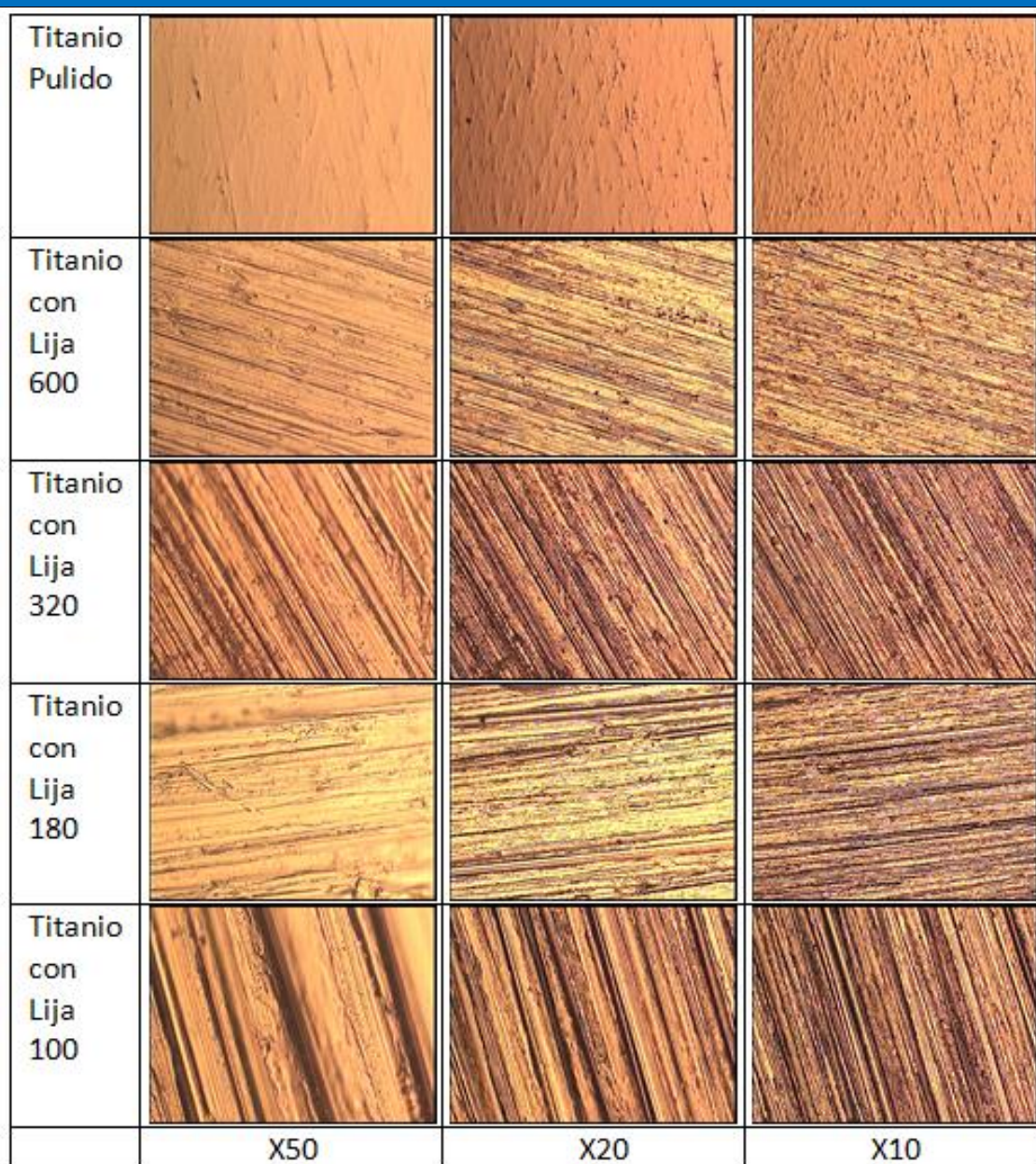


Figura 2. 29. Fotografías tomadas con el microscopio metalográfico para las muestras de Ti tratadas con diferentes lijas. Todas fueron pulidas previamente hasta polvo de alúmina de $0,3\ \mu\text{m}$ y luego se les realizaron los microcanales.

Se utilizó un perfilómetro de contacto para caracterizar las superficies con diferentes tratamientos de lijado para la formación de microcanales. La tabla 2.14 muestra los parámetros R_a y R_z y la gráfica del perfil.

Tabla 2. 14. Valores de rugosidad de las superficies tratadas con distintos abrasivos para lograr microcanales

Muestras	Parámetros		Perfiles
	Ra [μm]	Rz [μm]	
Grupo XXVI Control Ti pulido	0,085±0,04	0,47±0,08	
Grupo XXVI L100	1,10±0,54	7,29±0,88	
Grupo XXVI L180	0,73±0,09	4,68±0,68	
Grupo XXVI L320	0,35±0,04	2,25±0,29	
Grupo XXVI L600	0,20±0,02	1,40±0,19	

Como era de esperar la rugosidad y sus parámetros, Ra y Rz, disminuyen a medida que el acabado superficial es más fino. Los resultados muestran que este último parámetro (Rz) posee una disminución más pronunciada que Ra, esto se debe a que Rz se encuentra más influenciado por los valores extremos, máximos y mínimos del perfil, por lo que la rugosidad de una superficie con menos irregularidades en altura, estará relacionado con un menor Rz y una superficie más homogénea. De esto se puede decir que a medida que Ra baja en nuestros sustratos, la superficie estudiada posee una menor rugosidad media y mayor uniformidad.

El presente resultado demuestra una correlación directa entre el número de lija utilizado en cada muestra y la rugosidad final lograda. Además, las muestras con L100, L180 y L320 poseen valores de rugosidad dentro del rango de las rugosidades usadas actualmente por las marcas de implantes más conocidas en el mercado [75].

2.4. Conclusión

Se logró implementar un protocolo exitoso para la síntesis mediante anodizado electroquímico en un electrolito con iones F^- de nanotubos de TiO_2 en sustratos de Ti grado médico. La rugosidad superficial del sustrato de Ti afectó significativamente la morfología de nanotubos de TiO_2 obtenidos, donde las superficies de Ti pretratadas con lija papel 2000 dieron como resultado NT de TiO_2 con una mayor área interna. Se lograron obtener nanotubos ordenados de TiO_2 perfectamente limpios de residuos y de tipo cristalino optimizando los protocolos de limpieza y tratamiento térmico. Para el primer caso, el pulido químico en solución fresca de HF 1% y HNO_3 1% eliminó considerablemente los aglomerados de partículas de la superficie nanotubular. La limpieza por ultrasonidos con un equipo de 40k [Hz] y 19[W] produjo desprendimientos de la capa nanotubular de TiO_2 . La limpieza con solución de HCl 0,1 M eliminó los restos de óxidos de la superficie con NT de TiO_2 . Para el segundo caso, el tratamiento térmico a 450 [°C] no afectó la morfología de los NT de TiO_2 mientras que el realizado a 650 [°C] causó el colapso de las paredes de los tubos y el agrietamiento de la capa nanotubular. La capa nanotubular anódica sin tratamiento térmico presentó una estructura amorfa. La capa nanotubular anódica recocida a 450 [°C] resultó con fase anatasa y la tratada a 650 [°C] evidenció la presencia de fase anatasa y rutilo. Se observó que los valores de concentración y voltaje del proceso de anodizado son elementos claves en la síntesis de las estructuras nanotubulares. Para el caso del voltaje, nuestras investigaciones en el rango de 5-25 V revelaron dos mecanismos de crecimiento de nanotubos en la superficie de la lámina de titanio. Se observó una dependencia lineal entre el voltaje usado y el diámetro de los NT en el rango de 5-15 V, mientras que para potenciales más altos se observó una desviación positiva de la linealidad. Además, se logró la formación de microcanales paralelos en la superficie del Ti mediante un proceso simple y bajo costo. En síntesis, el tratamiento más estable para la obtención de nanotubos fue utilizando el método de anodizado con las siguientes condiciones: Solución de pulido químico HF 1% y HNO_3 1% por 5 min, luego lavado con abundante agua destilada, empleo de celda electroquímica bipolar con separación de 1 cm y condiciones de anodizado de: solución de trabajo de 0,5 % de HF, voltaje de anodizado de 20 V, tiempo de anodizado de 10 min y solución de pulido fresca para cada electrodo. Se adiciona 1ml de solución de detenimiento de NaOH al finalizar el anodizado y posterior lavado del sustrato con abundante agua destilada, finalmente usar solución de limpieza de 0,1M de HCl por 1 h.

3. Evaluación de la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* de muestras microacanaladas

Las infecciones asociadas a los implantes son causadas por la adherencia de las bacterias a los biomateriales. En este capítulo se prueba la propiedad antibacteriana de las muestras fabricadas y detalladas en el capítulo 2. También se estudian nuestras muestras como sustratos bases para la deposición de un agente inorgánico antibacteriano y su capacidad para adquirir una propiedad antibacteriana. Para ello se realizó una deposición de nanopartículas de plata mediante reducción en luz UV a partir de una solución de AgNO₃, la actividad antibacteriana se analizó contra *Staphylococcus aureus*.

Abreviaciones

E	<i>coli: Escherichia coli</i>
EDS	Energía Dispersiva de Rayos X
EPA	Agencia de Protección Ambiental
h:	horas
ISO	Organización internacional de normalización
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
PBS	Buffer fosfato salino
Ra	rugosidad media
Rz	rugosidad de profundidad media
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ti c.p.	titanio comercialmente puro
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV:	Ultravioleta

3.1. Introducción

A pesar de que los implantes de titanio (Ti) son la opción más usual cuando se quiere reemplazar una pieza dentaria, las infecciones en su superficie siguen siendo una complicación frecuente que aumenta las tasas de fracaso y la morbilidad del paciente, siendo esta la causa

más común de falla. Por un lado, el trauma quirúrgico reduce la resistencia del huésped para combatir infecciones, mientras que, por otro lado, el implante en sí mismo, como cuerpo extraño, aumenta el riesgo de infección lo que resulta en propagación e invasión de bacterias [191].

Una vez producida la infección, la terapia antibiótica convencional generalmente es ineficaz, lo que puede llevar a la remoción del implante, causando gran dolor y angustia al paciente. De acuerdo con la literatura, el tratamiento sistémico con antibióticos no brinda la concentración de fármacos efectiva en el sitio del implante. Una vez que el patógeno se adhiere al hueso o a la superficie de los implantes, genera cambios metabólicos y fenotípicos, que darán lugar a que los patógenos produzcan resistencia y escapen de la vigilancia inmunológica [192]. Por otro lado, los bajos niveles de antibióticos también pueden convertirse en la fuerza impulsora de la resistencia bacteriana a los medicamentos [193]. Por lo tanto, la prevención y el control de las infecciones asociadas a implantes ha atraído mucha atención en los últimos años.

Cuando las bacterias se adhieren y proliferan en la superficie del biomaterial, producen sustancias poliméricas extracelulares y forman una biopelícula. La biopelícula o *biofilm*, cubre a las bacterias y las protege del sistema inmunitario y de los agentes antibacterianos. Asimismo, la mayor competencia implícita para las bacterias incluidas en el biofilm es el mayor grado de transferencia horizontal de genes, incluyendo marcadores de resistencia a antibióticos resultando en una mejor resistencia a los antibióticos por parte del biofilm [194]. Como resultado, las infecciones relacionadas con implantes son extremadamente difíciles de tratar [195], [196]. Aunque se han ideado varios métodos de prevención, las infecciones relacionadas con implantes aún ocurren hoy en día en 0.2-17.3% de los casos de cirugía ortopédica protésica [197]–[199]. La mayoría de los implantes infectados requieren, a posteriori, una cirugía de extracción o revisión. Por lo tanto, la investigación sobre el problema de la adhesión bacteriana a los biomateriales es, por lo tanto, de importancia crítica desde una perspectiva clínica.

La mayoría de las infecciones relacionadas con implantes son causadas por el género *Staphylococcus* [200]–[202]. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es un conocido patógeno gram-positivo involucrado en un gran número de infecciones humanas [203]. Se ha demostrado que *S. aureus* tiene mayor afinidad por los sustratos de Ti, y se adhiere de forma consistente a la superficie de los implantes [204]. Curiosamente, *S. aureus* se aísla con frecuencia de sitios de implantes dentales fallidos y se asocia con resultados clínicos pobres dado que puede formar biopelículas en muchos biomateriales diferentes [205]–[207]. Generalmente, se cree que el proceso de adherencia bacteriana se rige por las interacciones de Van der Waals, de modo que las bacterias llegan a la superficie del material artificial al superar las barreras energéticas mediante la repulsión electrostática y luego forman colonias por adhesión inicial reversible / irreversible [192], [208].

Recientemente, se ha reportado en la literatura sobre el impacto de las propiedades físicas de los materiales sólidos sobre la adhesión bacteriana [209], [210] y se ha resaltado una relación particularmente fuerte entre la adhesión bacteriana y la rugosidad superficial [210]–[213]. Los factores principales que influyen en esta adhesión son la hidrofobicidad, interacciones electrostáticas, las fuerzas de Van der Waals y la rugosidad [214].

Las superficies más rugosas tienen una mayor área de superficie y las depresiones en las superficies rugosas pueden proporcionar sitios más favorables para la colonización. Algunos informes previos han demostrado que la adhesión bacteriana in vivo está determinada

principalmente por una rugosidad superficial de Ra mayor que $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (200 nm) [215], [216]. Por otro lado, Lee et al informaron en un estudio in vitro que la cantidad total de bacterias adherentes en la resina (Ra = $0.179\text{ }\mu\text{m}$) era significativamente más alta que en titanio (Ra = $0.059\text{ }\mu\text{m}$) o zirconia (Ra = $0.064\text{ }\mu\text{m}$). [217]. Por lo tanto, aún no se ha obtenido un consenso general en la literatura con respecto al nivel mínimo de rugosidad requerido para la adhesión bacteriana

Los implantes comercialmente disponibles presentan en su mayoría rugosidades micrométricas en el rango de $0,3\text{--}3\text{ }\mu\text{m}$ [74], [75]. La principal razón es que una rugosidad micrométrica exhibe mayor área superficial lo que facilita la osteointegración y permite el crecimiento interno de los tejidos [218], [219]. Esto se basa en el hecho de que el tejido óseo puede adaptarse a irregularidades de superficie en el rango de $0,5\text{ a }100\text{ }\mu\text{m}$ por lo que alterando la topografía de la superficie de un implante se puede mejorar en gran medida su estabilidad [219]. A su vez, dichas modificaciones, en algunos casos pueden adicionar una característica antibacteriana al implante en donde las micro y nano estructuras puede provocar el estiramiento de los microorganismo y desencadenar su muerte [220].

Entre los métodos mecánicos más empleadas para lograr microrugosidades se pueden mencionar el mecanizado, lijado y arenado [221]. El mecanizado (torneado, fresado, roscado) no es realmente un método de tratamiento superficial, pero por otro lado puede ser utilizado para producir topografías superficiales específicas. Las propiedades de las superficies mecanizadas dependen principalmente de la velocidad y presión de la pieza de trabajo y la elección del lubricante. En un implante mecanizado la superficie se caracteriza por presentar surcos y valles más o menos orientado a lo largo de la dirección de mecanizado [221], dependiendo de los parámetros del proceso tenemos valores de Ra entre $0,3\text{--}0,6\text{ }\mu\text{m}$ [222], [223]. En cuanto al rectificado y el pulido mecánicos son métodos idénticos y se basan en la eliminación de parte de la superficie utilizando un abrasivo [221], [224]. El primero implica el uso de partículas gruesas como abrasivos resultando en rugosidades que van desde $1\text{ }\mu\text{m}$ hasta $5\text{--}6\text{ }\mu\text{m}$ dependiendo del abrasivo usado [224]. Mientras que el segundo, pulido mecánico, implica el uso de un material abrasivo fino que se aplica a una rueda flexible o un cinturón que luego se pone en contacto directo con el implante. El pulido siempre se lleva a cabo en presencia de lubricante. Durante el proceso inicial papel abrasivo es grueso ($50\text{--}220$ granos/ cm^2) seguido por el uso de un abrasivo más fino (alrededor de 600 granos/ cm^2) a una velocidad de $10\text{--}30\text{ m/s}$ [225]. El pulido generalmente se lleva a cabo usando SiC, alúmina o diamante para producir superficies suaves o espejadas, los valores de rugosidad pueden ser Ra de $0.1\text{ }\mu\text{m}$ o menos [226]. Finalmente, el arenado es otro método físico para crear topografías superficiales en los implantes. Consiste en el bombardeo con partículas secas o suspendidas en un líquido a alta velocidad. Dependiendo del tamaño de la partícula utilizada se pueden lograr diferentes rugosidades, por ejemplo; para partículas de alúmina en el rango de tamaño de $25\text{--}75\text{ }\mu\text{m}$ se obtiene una rugosidad media en el rango de $0.5\text{--}1.5\text{ }\mu\text{m}$ [223], [225], [227]

Por otro lado, la modificación de la superficie de los materiales del implante es una forma efectiva de reducir o inhibir la aparición de infecciones asociadas a los mismos. Los implantes modificados con agentes antibacterianos no solo aseguran una actividad antibacteriana aplicada en la superficie del implante, sino que también evitan potenciales problemas causados por el uso excesivo de antibióticos, como la resistencia bacteriana a los medicamentos y la formación de superbacterias [191]. Además, la aparición de nuevos antibióticos es limitada, por lo que otras técnicas de preventivas para minimizar la propagación microbiana son necesarias

Diversas estrategias para la fabricación de recubrimientos antibacterianos han sido descriptas. Dichos recubrimientos normalmente pueden contener un agente activo como ser iones o nanopartículas de plata, cobre, zinc, cloruros, ioduros o antibióticos; moléculas inmovilizadas activadas por contacto como por ejemplo polímeros de amonio cuaternario; o moléculas activadas por luz, como por ejemplo TiO_2 que es un fotocatalizador [228], [229]. De acuerdo con este último ejemplo nuestras muestras con NT de TiO_2 serían potencialmente antibacterianas mediante un proceso fotocatalítico. Sin embargo, en esta oportunidad no vamos a explotar esa propiedad considerando que el objetivo final de nuestros sustratos es la modificación de las superficies de implantes médicos. Por lo cual dichos sustratos una vez implantados no podrán ser expuestos a ningún tipo de radiación UV.

Recientemente, los agentes antibacterianos que incluyen plata, cobre (Cu) y zinc (Zn) incorporados en los NT de TiO_2 han atraído mucha atención [230]–[232]. Entre ellos, la incorporación de Ag ha ganado especial atención debido a su amplio espectro de propiedades antibacterianas y fungicidas, incluyendo contra cepas que son resistentes a antibióticos. Además han demostrado ser la nanopartícula dominante en los recubrimientos utilizados en el mercado manifestando un adecuado funcionamiento antibacteriano [233]. Estudios sobre los mecanismos antibacterianos de Ag han demostrado que se une a la pared celular bacteriana, dañando la función de la membrana celular bacteriana [234], [235]. La Ag también inhibe la proliferación de bacterias a través de interacciones con la estructura del ADN de las bacterias [235]. Recientemente los mecanismos de acción de los metales contra las bacterias han sido revisados [236]. Particularmente para las NP de Ag, las mismas poseen una gran área superficial, lo que permite una alta liberación de iones de plata lo que consiste en la forma activa del antimicrobiano. Los iones Ag pueden unirse eficazmente a los grupos tiol, una característica común a muchas proteínas, y desempeñar un rol estructural y funcional en las células bacterianas causando la muerte del microorganismo. Los mismos se pueden unir a proteínas de la pared celular y conducir a su ruptura, se pueden unir y alterar enzimas cruciales para la respiración y el metabolismo celular; y finalmente pueden interferir con el ADN a través de la división celular y la replicación [237]. Las múltiples acciones de los iones de plata explican que no exista resistencia por parte de los microorganismos, en comparación con los antibióticos [237], [238]. Un mecanismo de acción análogo se ha descrito para otros iones metálicos (por ejemplo, Cu, Zn) [239], [240].

Estándares para el estudio del efecto antibacteriano

El manejo y manipulación de microorganismos potencialmente peligrosos requiere un alto grado de competencia técnica y resulta de gran importancia cuando se pretende probar la respuesta bacteriana a un material dado. Por ello el procedimiento a seguir debe ser llevado a cabo por personal capacitado en técnicas microbiológicas y debe estar sujeto a la legislación y regulaciones nacionales vigentes.

La organización internacional de normalización o ISO por sus siglas en inglés desarrolla y promueve el uso de diferentes estándares a nivel mundial cubriendo desde productos manufacturados y tecnología a seguridad alimenticia, agricultura y sanidad. La norma ISO 22196 determina la actividad y eficacia antibacteriana de productos antimicrobianos en superficies plásticas y otras superficies no porosas. Propone estudiar el efecto de dos cepas bacterianas en suspensión individualmente, *S. aureus* y *Escherichia coli* (*E. coli*), aplicadas directamente sobre las superficies que se suponen tienen el antimicrobiano, así como sobre las superficies control para conocer la reducción de la carga bacteriana bajo el efecto del material estudiado.

A medida que nuestro conocimiento de materiales antimicrobianos mejora continuamente, los organismos reguladores y grupos de trabajo como la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) han reconocido que no existen métodos estandarizados para determinar la eficacia de los materiales bajo las condiciones en las que va a ser usado. De esta manera la OCDE entre otras cosas, se aboca a estudiar en profundidad los estándares internacionales existentes y provee de estudios y métodos para mejorar la generalidad y uso de estos. De aquí que, a través de un Documento Guía publicado en el 2014 estudió la aplicación de la norma ISO 22196 para materiales porosos y no porosos tales como textiles, papel, plásticos, metales, diferentes recubrimientos de superficie, cerámicos, entre otros [241]. Aquí quedó demostrado que el protocolo ISO 22196 es apropiado para la evaluación antimicrobiana tanto de superficies porosas como no porosas.

Por lo tanto, en este capítulo se estudiará el efecto de las superficies desarrolladas frente a la bacteria *S. aureus* usando un protocolo estándar de validez internacional. Para ello se estudió la norma ISO 22.196 y se propusieron ciertas modificaciones en base a la norma DIN 13.697. Además, se demostró que nuestras muestras pueden ser usadas como sustrato base para depositar NP de Ag lo cual permitirá adicionar a nuestras superficies una característica antibacteriana.

3.2. Materiales y Métodos

La actividad antibacteriana de las muestras fue evaluada frente a la bacteria tipo Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, amablemente cedida por el Dr. Miguel Fernández de Ulivarri. La norma ISO-22196 especifica en sus escritos las cepas bacterianas que deben utilizarse, sin embargo, permite realizar los ensayos con cepas diferentes a las mencionadas siempre y cuando se informe expresamente la especie en el ensayo. El extracto de levadura, peptona de digestión pancreática de Caseína y Agar-Agar fueron provistos por Neogen (Argentina), mientras que la glicerina y sales fueron adquiridas via Biopack (Argentina). Todos los ensayos fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Medios e Interfases en cabina de seguridad biológica clase II-B2, siguiendo protocolos de bioseguridad nivel 2.

Fabricación de las muestras para el ensayo antibacteriano

La fabricación de las muestras de Ti microacanaladas con NT de TiO_2 se realizó en base a protocolos y parámetros previamente optimizados, ver capítulo 2. A continuación se los detalla brevemente.

Los sustratos de Ti fueron cortados en forma cuadrangular de $5 \times 5 \text{ mm}^2$ a partir de una placa de Ti c.p. grado 2 usando una cortadora de precisión montada con un disco de filo diamantado y abundante líquido de refrigeración. Una vez cortadas las muestras los sustratos fueron limpiados sucesivamente en acetona, alcohol isopropílico y agua destilada durante 5 min. Luego fueron contactados eléctricamente e incluidos en resina acrílica. Posteriormente los sustratos fueron pulidos en una pulidora metalográfica de precisión con lijas al agua de SiC de granulometría 320, 600, 1000, 1500 y 2000; y luego pulido con suspensión de alúmina de $1 \mu\text{m}$ y de $0,3 \mu\text{m}$. Seguidamente, dichas muestras fueron separadas en 5 grupos en donde cada grupo fue sometido a un último pulido final con una granulometría específica, a saber, L100, L180, L320, L600 y pulido, lijados con lija de 120, 180, 320 y 600 granos/ cm^2 y pasta de alúmina $0,3 \mu\text{m}$, respectivamente, de manera de obtener superficies microacanaladas con diferentes rugosidades micrométrica.

Posteriormente las muestras fueron limpiadas en un sonicador utilizando alcohol isopropílico y agua destilada por 10 minutos para asegurar la remoción de cualquier partícula residual del pulido.

A continuación, algunas muestras fueron anodizadas, por lo que, cada electrodo de Ti fue sumergido en una solución de pulido químico HF 1% y HNO_3 1% durante 5 min y luego lavado con abundante agua destilada. Para el anodizado electroquímico se empleó una celda electroquímica bipolar, conectando como ánodo el electrodo de Ti y como cátodo una chapa de Pt incluida en acrílico, la separación entre ellos fue ajustada en 1 cm. En esta etapa las condiciones de anodizado fueron: concentración de la solución de trabajo de 0,5 % de HF, voltaje de anodizado de 20 V, tiempo de anodizado de 10 min y solución de pulido fresca para cada electrodo de manera de asegurar una correcta limpieza. Inmediatamente luego de cumplirse el tiempo de anodizado se adicionó 1ml de solución de detenimiento de NaOH y posteriormente el electrodo fue lavado con abundante agua destilada. Seguidamente al anodizado las muestras fueron colocadas por 1 h en una solución de limpieza de 0,1M de HCl.

Deposición de plata

Cierto grupo muestral de electrodos con NT de TiO_2 fue depositado con NP de Ag mediante el método de reducción ultravioleta (UV). Se utilizó como material precursor nitrato de plata para

preparar una solución de agua y etanol 1:1 con una concentración de 0,1 M AgNO₃. seguidamente las muestras fueron sumergidas en dicha solución y colocadas en una cámara UV totalmente a oscuras para ser irradiadas con luz UV de 365 nm a 4W.

Caracterización físico-químicas de las muestras

La evaluación morfológica de las muestras se realizó usando un MEB de emisión de campo (Supra 55VP, Zeiss, CIME, Tucumán). con un detector de electrones secundarios IN LENS a 5 kV, WD= 5mm y con magnificación de 500X, 5kX, 15kX y 50kX. La evaluación química se realizó mediante Espectroscopia de Energía Dispersiva de rayos X (EDS) con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Supra 55VP, Zeiss, CIME, Tucumán) equipado con un detector de energía dispersiva de rayos X (Inca Energy 250, Oxford instruments).

La caracterización de la rugosidad se realizó cualitativa y cuantitativamente primero observando las superficies con el MEB mencionado previamente, y en segundo lugar la determinación cuantitativa de la rugosidad superficial se llevó a cabo con un rugosímetro bidimensional de contacto (Taylor Hobson, GlyA “Laboratorio Tandar”, CNEA, Buenos Aires). Se realizaron 3 lecturas de rugosidad en distintas direcciones para cada una de las muestras con un recorrido en longitud de 3,1 mm. La cuantificación de los parámetros de rugosidad superficial se efectuó con el software Ultra a partir del perfil de rugosidad modificado (perfil R). Se calcularon valores para dos parámetros de descripción vertical (o altura) del perfil R: R_a y R_z. Las descripciones y los cálculos de estos parámetros se realizaron de acuerdo con la norma ISO 4287:1997 como se describió en el capítulo 2.

En la tabla 3.1 se resumen los diferentes grupos muestrales estudiados a lo largo de la evaluación antibacteriana.

Tabla 3. 1. Resumen de los grupos muestrales acorde a los diferentes tratamientos superficiales realizados

Control	Ti pulido (pasta de alumina 0,3 µm)
Microacanalados	L120
	L180
	L320
	L600
Microacanalados + Nanotubos +NP de plata	Ti pulido + NT a 20V + NP de Ag
	L120 + NT a 20V + NP de Ag
	L180 + NT a 20V + NP de Ag
	L320 + NT a 20V + NP de Ag
	L600 + NT a 20V + NP de Ag

Medios de cultivo

Dada la reproducibilidad lote a lote comprobada en ensayos preliminares, así como su capacidad para sostener el crecimiento de múltiples patógenos, se utilizó el medio estándar de crecimiento tipo Luria-Bertani-Miller (LBM). Sus ingredientes y respectivas concentraciones son detalladas en la tabla 3.2 para el caldo de cultivo y en la tabla 3.3 para el medio LBM agar. La preparación se realizó usando agua destilada y posteriormente fueron esterilizados mediante autoclave a 121°C por 20 minutos y almacenados en la heladera por no más de 1 mes. Para el caso de la preparación del agar, luego de la esterilización, el medio fue rápidamente vertido en placas individuales de Petri y se apartaron en una cabina de seguridad

hasta solidificar a temperaturas menores de 60°C para finalmente almacenar las placas con el agar solidificado en la heladera.

Tabla 3. 2. Ingredientes y sus respectivas concentraciones para caldo LBM

Ingrediente	Concentración
Cloruro de Sodio (NaCl)	10 g/l
Extracto de Levadura	5 g/l
Triptona/Peptona de Caseína	10 g/l

Tabla 3. 3. Ingredientes y concentraciones respectivas para placas de agar LBM

Ingrediente	Concentración
Cloruro de Sodio (NaCl)	10 g/l
Extracto de Levadura	5 g/l
Triptona/Peptona de Caseína	10 g/l
Agar-agar	14 g/l

Buffer fosfato salino (PBS)

El PBS es una solución isotónica que mantiene el pH estable. Se utilizó para diluir las cepas bacterianas. La esterilización se realizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se almacenó a 4°C durante no más de 1 mes. Sus ingredientes y concentraciones respectivas se muestran en la tabla 3.4, para su preparación las sales fueron pesadas y disueltas en agua destilada.

Tabla 3. 4. Ingredientes y concentraciones respectivas para PBS

Ingrediente	Concentración
Cloruro de sodio (NaCl)	8 g/l
Cloruro de potasio (KCl)	0,2 g/l
Di-sodio hidrogeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4)	1,15 g/l
Potasio di-hidrogeno fosfato anhidro (KH_2PO_4)	0,2 g/l

Para la preparación de la solución PBS-10% peso en peso preparada en glicerol, se utilizaron los mismos ingredientes mencionados anteriormente, pero éstos fueron disueltos en glicerol previamente filtrado con papel de filtro (0,45 µm).

Esterilización

Antes de cada ensayo, las muestras finales de Ti fueron esterilizadas mediante la técnica de vapor húmedo usado un autoclave a 121°C por 15 minutos (autoclave modelo H16LBV, Ficoinox, Argentina). Pinzas, tubos de vidrio, material plástico y películas de polipropileno fueron sometidos a esterilización también fueron sometidos a esterilización por autoclave usando los mismos parámetros.

Banco de trabajo de Staphylococcus aureus

Para la preparación del banco de trabajo, se procedió a inocular e incubar por triplicado durante 18 horas a 37°C, 5 ml de caldo LBM con 100 µL de una suspensión bacteriana de *S. aureus* previamente activada. Subsecuentemente, los cultivos fueron secuencialmente diluidos y cuantificados mediante el método de conteo en placa de agar. En función de los resultados obtenidos, un segundo juego de tubos con 5 ml de caldo LBM inoculado con 100 µL de suspensión de *S. aureus* previamente activada, fue incubado durante 18 horas a 37°C para

luego ajustar su concentración a 5×10^8 UFC/ml. Los cultivos fueron entonces alicuotados en tubos de 5 ml para luego ser centrifugados a 2000 g durante 10 minutos y enjuagados con 5 ml de PBS dos veces consecutivas. Finalmente, los pellets de *S. aureus* fueron resuspendidos en 1 ml de caldo LBM-10% Glicerina, alicuotados en criotubos y almacenados a -20°C para su posterior uso en los diferentes ensayos.

Evaluación antibacteriana: etapas del análisis

Este ensayo es una adaptación del estándar internacional *ISO 22.196: Medición de actividad antibacteriana en plásticos y otras superficies no porosas*, propuesto por la Organización Internacional de Normalización.

El esquema de la figura 3.1 enumera los pasos a seguir del protocolo de partida e incluye las modificaciones al mismo basadas en la norma DIN 13697. A continuación, se describe cada etapa para la optimización del protocolo.

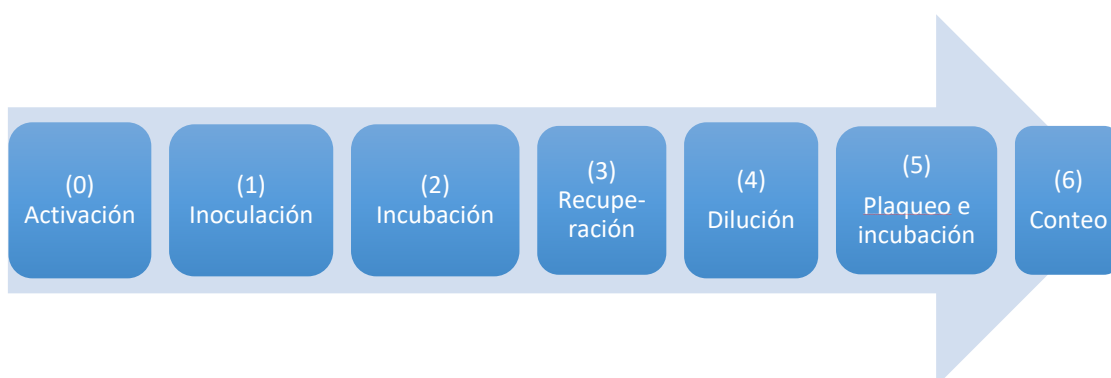


Figura 3. 1. Esquema de las principales etapas de la evaluación antibacteriana

- Etapa 0 - Activación de las cepas

Dado que las cepas se conservan a -20°C , antes de comenzar con los ensayos, las mismas fueron activadas y sembradas a 37°C . Para ello, se descongeló parcialmente un vial con 1×10^8 UFC/ml del cual se tomaron 100 μl que se disolvieron en 5ml de caldo de cultivo. Tal dilución se incubó durante 6 horas a 37°C o hasta alcanzar aproximadamente 1×10^8 UFC/ml. De esta última dilución, se tomaron nuevamente 100 μl que se disolvieron nuevamente en 5 ml y se incubaron durante 24 horas a 37°C . A partir de aquí, la cepa se considera activa y lista para utilizar.

- Etapa 1 - Inoculación

Para preparar la solución de inoculación, se disolvieron 150 μl de la cepa activada en 850 μl de PBS, de forma tal de alcanzar un valor de concentración de alrededor 10^6 - 10^7 UFC/ml. Seguidamente, se colocaron las muestras a evaluar estériles en una placa de Petri y se pipeteó sobre cada una 10 μl del inóculo previamente preparado, ver figura 3.2. Luego se colocó encima de cada muestra inoculada una película de polipropileno estéril de menor dimensión que las muestras de Ti ($4 \times 4 \text{ mm}^2$), el cual fue presionada suavemente sobre la muestra de forma tal de extender la gota de inóculo por toda la superficie cuidando que la misma no se extienda más allá de los límites de la muestra. Según la norma ISO 22.196 este film ayuda a evitar la evaporación del inóculo durante la incubación de este.

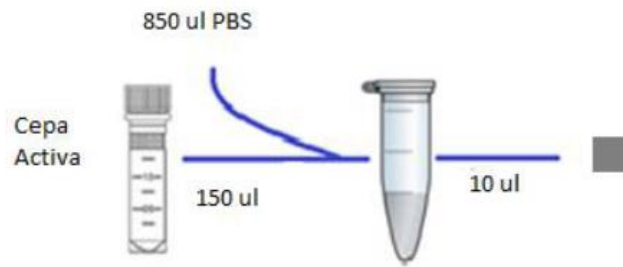


Figura 3. 2. Esquema de inoculación de la muestra de Ti

- Etapa 2 - Incubación de las muestras inoculadas

Los sustratos en contacto con el inóculo fueron incubados a de 35°C por 24 h o 2 h de manera de estudiar cómo influye la característica superficial de cada muestra en la adhesión inicial de las bacterias *S. aureus*.

- Etapa 3 - Recuperación de las muestras

En esta etapa se recuperan y disuelven los microorganismos sobrevivientes luego de la incubación en contacto con la muestra potencialmente antibacteriana, ver figura 3.3. Consiste transferir el sistema estudiado (muestra + inóculo + película de polipropileno) a un tubo Falcon con 990µl de PBS. Para lograr un desprendimiento efectivo del material biológico adherido al sustrato, cada tubo fue vortexeado a altas velocidades durante 1 minuto cada uno.

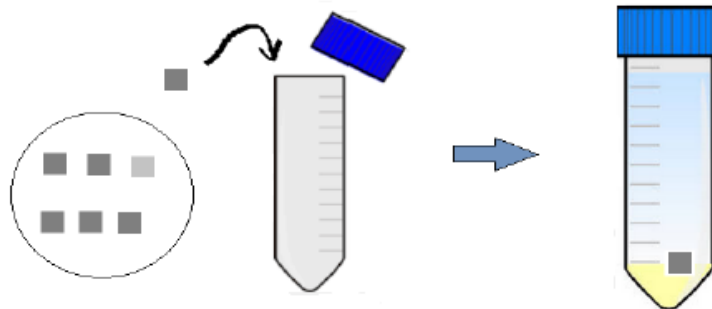


Figura 3. 3. Recuperación del material biológico sobre las muestras luego de haber sido incubadas a 37°C. Las muestras junto al inóculo y la película de polipropileno son sumergidas en PBS y posteriormente vortexeadas

- Etapa 4 - Dilución de los microorganismos sobrevivientes

Dado que el número de UFC diluidos en PBS luego de la recuperación es desconocido, es necesario diluir las soluciones secuencialmente para su posterior plaqueo y recuento de los microorganismos sobrevivientes de acuerdo con lo establecido por la norma ISO 22.196. Por ello, previo a sembrar la dilución bacteriana sobre el medio agar, se realizaron tres diluciones para cada muestra, a saber 1:10, 1:100 y 1:1000, ver figura 3.4.

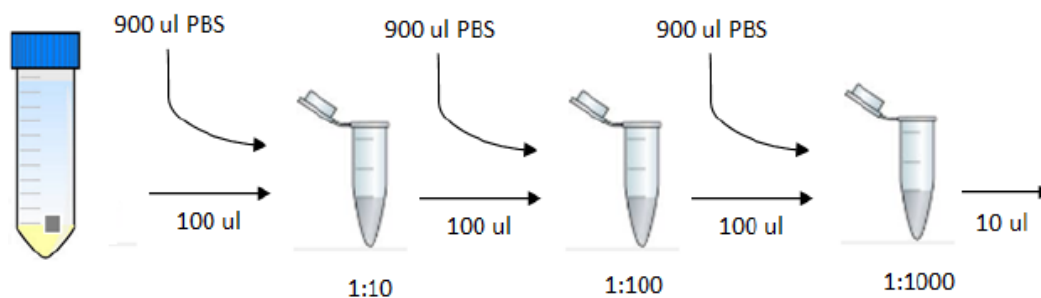


Figura 3. 4. Proceso secuencial de dilución. Los microorganismos recuperados en PBS fueron diluidos en razón de 1:10, 1:100 y 1:1000 y posteriormente colocados en la placa de Petri

- Etapa 5 - Plaqueo e incubación

Para realizar el plaqueo se utilizaron placas de Petri con medio LBM agar. Previamente, utilizando un marcador indeleble, se dividió en 8 porciones cada placa. Cada porción de la placa fue debidamente etiquetada con la dilución correspondiente y con la identificación de la muestra de estudiada. En cada división se colocaron tres gotas de 10 µl de una dilución en particular de forma tal de obtener un conteo por triplicado de cada muestra, figura 3.5. Una vez realizado el plaqueo, las placas se dejaron secar bajo el flujo laminar y posteriormente se cerraron e incubaron durante 24 horas a 35°C de manera invertida.

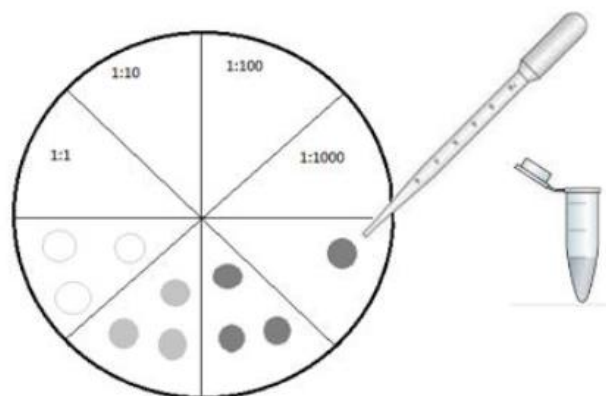


Figura 3. 5. Esquema de división de las placas de Petri con medio LBM agar para plaqueo e incubación. En cada división se pipetearon 10 µl de cada dilución a evaluar

- Etapa 6 – Conteo

Luego de la incubación, se retiraron las placas de Petri de la estufa y se realizó el conteo de las UFC sobrevivientes. Tales valores fueron multiplicados por el factor de dilución correspondiente y posteriormente graficados. En todos los casos se compararon las muestras frente a un inóculo que no estuvo en contacto con ninguna muestra. El número ideal de conteo debe estar entre 1 a 30 UFC por gota inoculada sobre la placa. La tabla 3.5 muestra los factores de diluciones acorde a las diluciones realizadas.

Tabla 3. 5. Factores de dilución respecto a las diluciones realizadas

Dilución	Factores de dilución
1:1	10^4 UFC
1:10	10^5 UFC
1:100	10^6 UFC
1:1000	10^7 UFC

Ensayos realizados

- Evaluación del efecto antibacteriano de superficies de titanio microacanaladas

La evaluación del efecto antibacteriano de los microcanales se estudió utilizando muestras de diferentes rugosidades L100, L180, L320, L600 y pulido, esta última corresponde a la muestra control. Además, en cada ensayo se adicionó una medición del crecimiento del inóculo solo para asegurar que las bacterias proliferan con normalidad. El protocolo microbiológico usado fue descrito previamente en este capítulo. Las condiciones de inoculación para este ensayo corresponden a las sugeridas por la norma ISO 22.196 (35°C por 24 h).

- Evaluación del efecto antibacteriano de superficies de titanio microacanaladas, con NT de TiO_2 y con deposición de Np de Ag

Con motivo de demostrar que nuestros sustratos pueden ser usados como base para otras deposiciones, en esta etapa se depositó NP de Ag en la superficie de las muestras de manera de concederles una propiedad antibacteriana. Para ello, se utilizaron muestras de Ti con diferentes rugosidades iniciales (L100, L180, L320, L600 y pulido) que posteriormente fueron anodizadas a 20 V y luego fueron inmersas en una solución de nitrato de plata 0,1M por 18 minutos mientras eran irradiadas con luz UV de longitud de onda 365 nm, tal cual se detalló previamente en este capítulo. En este ensayo, el tiempo de inoculación fue reducido a 2 horas considerando que la propiedad antibacteriana fue aumentada con la presencia de la plata.

3.3. Resultados y Discusión

Modificación de la norma ISO 22.196

Para encarar el análisis antibacteriano de las superficies de Ti tratadas se estudiaron distintas normativas nacionales e internacionales que describan un método eficaz para tal fin. Sin embargo, no se encontró ninguna norma específica para realizar el análisis sobre superficies de titanio, razón por la cual se optó por buscar un estándar de evaluación antibacteriana específico para otro tipo de sustratos y considerar su aplicación a nuestro material deseado. Luego de revisar el estado del arte se decidió utilizar la norma internacional ISO 22.19 como método estándar para evaluar nuestros sustratos. Sin embargo, fue necesario realizar mínimas modificaciones basadas en la norma DIN 13697, las mismas son detalladas en la tabla 3.6.

Tabla 3. 6. Descripción de los cambios realizados en el protocolo propuesto por la norma ISO 22.196 para el análisis antibacteriano de muestras de Ti

Condición	Según la norma	Modificación
Medios de cultivos	Se indican los medios de cultivo específicos para cada proceso, pero permite utilizar otros medios detallando exactamente su composición	Se usó un medio de cultivo cuyo preparado posee los nutrientes necesarios para la cepa <i>S. aureus</i> el cual fue previamente estudiado y usado en ensayos anteriores con la misma cepa
Método de esterilización	Calor seco (180°C en 30 min) Calor Húmedo (121°C; 15')	Luz UV (260nm; 15') Calor húmedo (121°C; 15')
Muestras	Polímeros de dimensiones 50mm2 por 10mm de espesor	Titanio de dimensión 5mm2 por 1 mm de espesor. Se reduce el tamaño para ahorrar en material.
Microrganismo	Se indica que los ensayos deben ser realizados con <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	Solo la bacteria <i>S. aureus</i> fue utilizada para una primera aproximación en los ensayos antibacterianos. Según la norma ISO 22.196 esta bacteria presenta mayor variabilidad en los resultados respecto a <i>E. coli</i> .
Inoculación de las muestras	Se indica la cantidad de inóculo a colocar en las muestras de tamaño específico.	La cantidad de inóculo usada se calculó en forma proporcional al tamaño de las muestras. Una cantidad mayor a la usada (10µl) se derramaría.
Incubación	En estufa a 35°C por 24 h.	El tiempo de incubación fue reducido para uno de los ensayos considerando que la característica antibacteriana de las muestras fue aumentada
Dilución y plaqueo	La dilucion es necesaria debido a la alta concentración de bacterias. Este plaqueo implica un gasto grande de materiales.	El plaqueo propuesto es de dividir la placa de petri en 8 secciones y se pipetea 10µl de la solución diluida por triplicado en cada sección. Ensayo de difusión de disco modificado.
Incubación y conteo	Incubar por 48 hs a 35°C. Para el tamaño de la muestra el número de UFC varia entre 30 a 300.	Las UFC ya se pueden contar luego de 24 hs de incubación. El número de colonias formadas óptimo es de 5 a 30 UFC por spot.

Evaluación del efecto antibacteriano de superficies de titanio microacanaladas

Las muestras con microcanales fueron caracterizadas por su rugosidad a través de los perfiles obtenidos por el rugosímetro y su parámetro Ra (valor promedio de la rugosidad) el cual fue graficado en función de la granulometría aplicada. La figura 3.6 muestra el diagrama de caja con los valores de rugosidad promedio de las muestras analizadas en función de la granulometría aplicada. Como se esperaba, Ra disminuye a medida que el acabado superficial es más fino. Para analizar la topografía se tomaron micrografías de las superficies estudiadas a diferentes magnificaciones. La figura 3.7 muestra las microfotografías de las superficies estudiadas, se observa la formación adecuada de microcanales paralelos entre sí y con un espaciado de acuerdo con la granulometría de la lija fabricados.

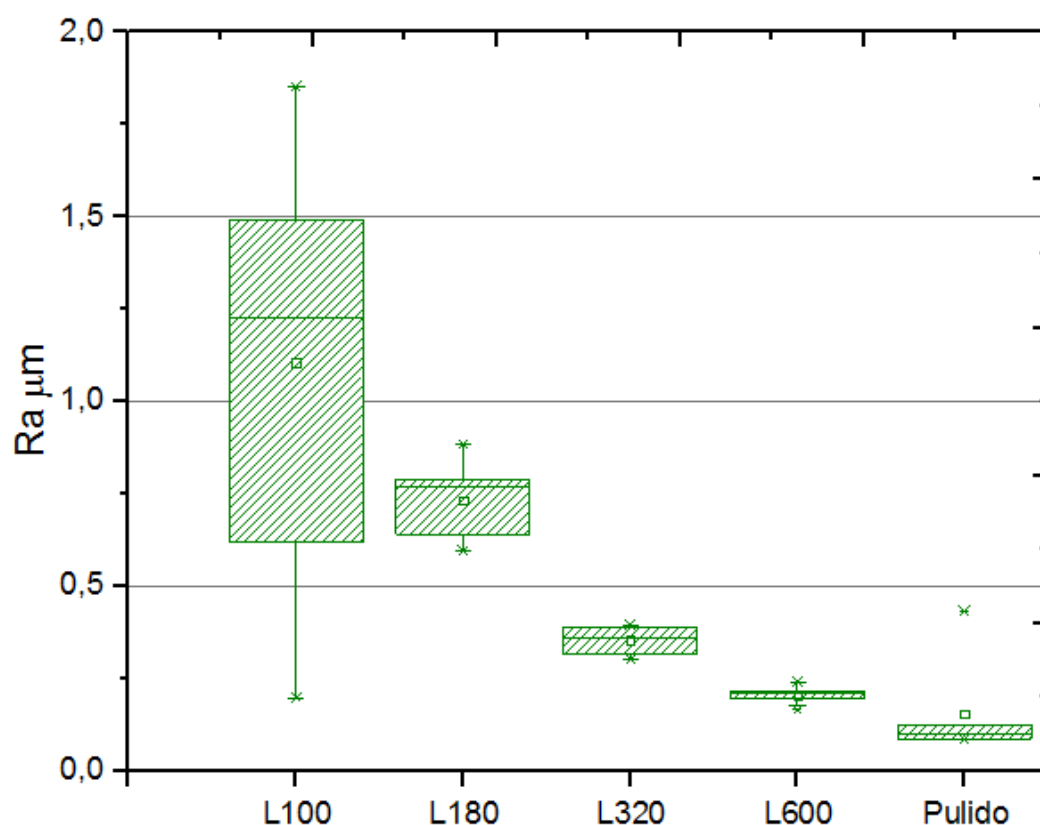


Figura 3. 6. Gráfico de cajas representando el valor promedio de la rugosidad para las superficies trabajadas con diferentes lijas. Obsérvese que la rugosidad va decreciendo con un acabado superficial más fino.

Una vez optimizados y caracterizados los parámetros se evaluó el efecto antibacteriano de las superficies microacanaladas con lijas de granulometría nº 100, 180, 320 y 600 y de la muestra pulida, todas ellas incubadas con el inóculo durante 24 horas a 35°C. En la figura 3.8 se muestran los resultados del efecto del ensayo antibacteriano que presentan las superficies de titanio con diferentes microcanales, donde se agrega una muestra control para mostrar el crecimiento del inóculo en la placa de Petri

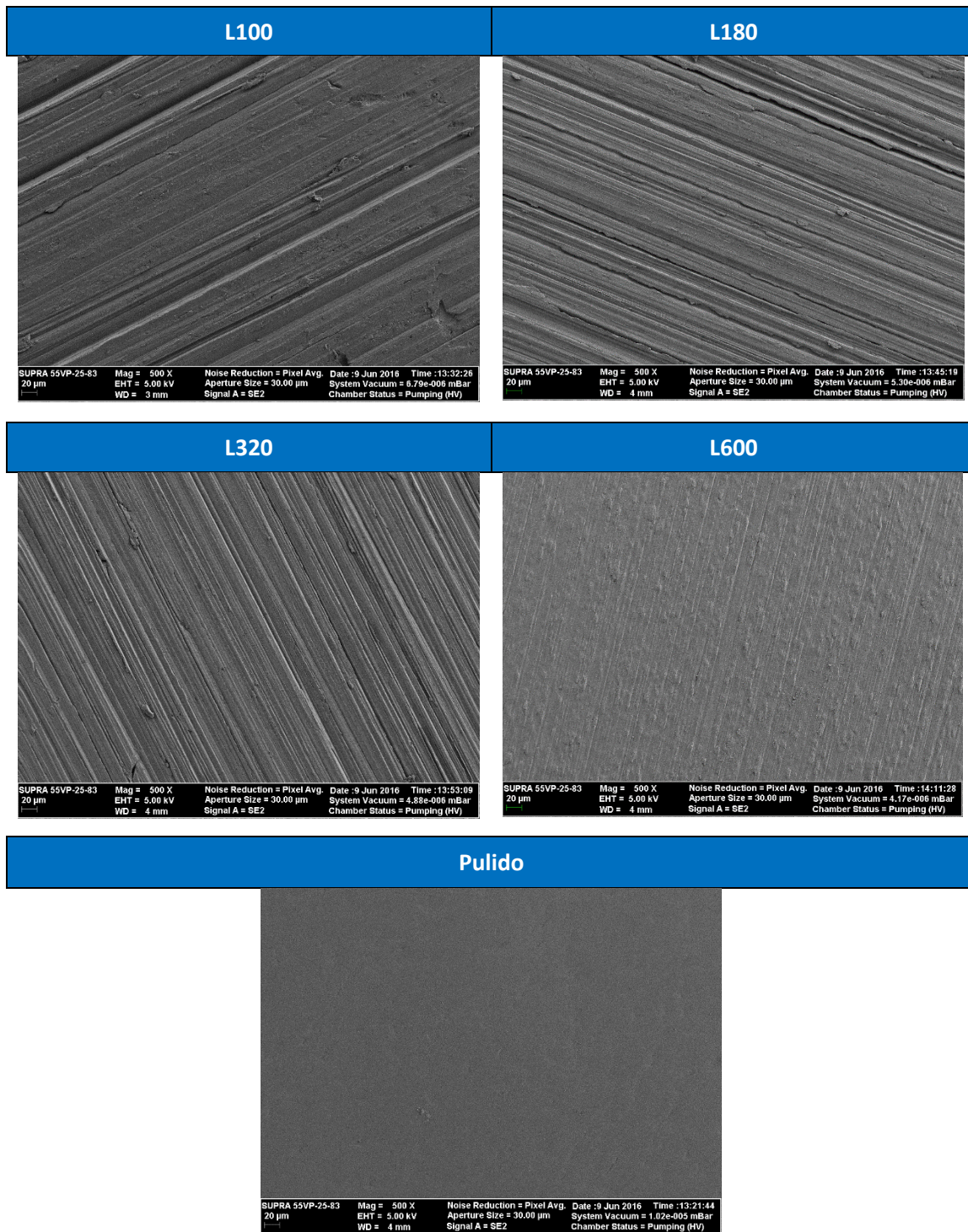


Figura 3.7. Micrografías MEB de las muestras microacanaladas previo al anodizado con una magnificación de 500X, a) L100, b) L180, c) L320, d) L600 y e) pulido alumina 0,3 µm

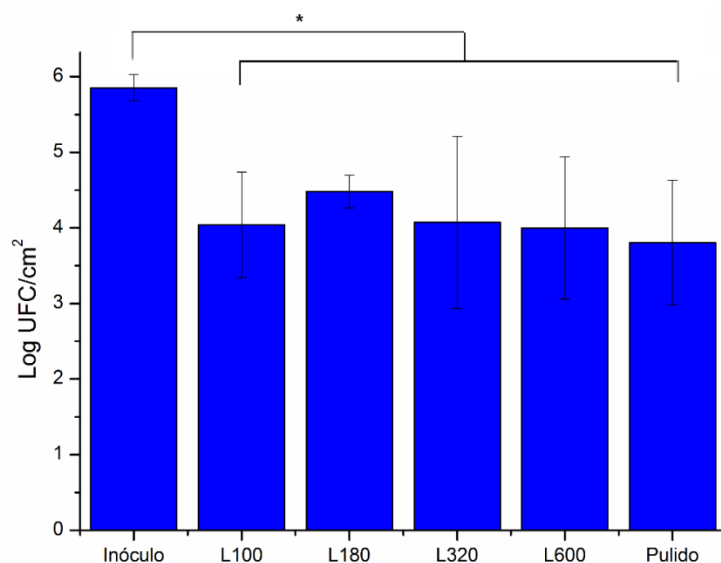


Figura 3. 8. Evaluación del efecto antibacteriano de los microcanales en superficies de titanio de 5x5mm². Obsérvese una reducción de la población de bacterias de las muestras acanaladas respecto del inóculo (*) $p \leq 0.005$

Posterior a la etapa de inoculación un grupo de muestras fue analizada por MEB previa fijación del material biológico; las imágenes se muestran en la figura 3.9. Aquí las bacterias *S. aureus* pueden distinguirse por su forma de cocos adheridas a la superficie, en las imágenes se resaltaron los microorganismos en círculos azules.

A partir de la figura 3.8 se puede apreciar que todos los sustratos de Ti presentan una diferencia significativa de crecimiento (con $p \leq 0.005$) comparando con el inóculo crecido en medio de cultivo, esto solo sugiere que el medio agar LBM es óptimo para el crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, no se observa ninguna diferencia significativa de crecimiento entre las diferentes rugosidades superficiales de las muestras estudiadas. Por lo que la modificación de las superficies con los microcanales y por ende las diferentes microrugosidades no adicionan ningún efecto frente a la respuesta antibacteriana de los microorganismos.

Esto difiere de lo esperado considerando los trabajos reportados en la bibliografía en donde se expone que al aumentar la rugosidad mejora la adhesión bacteriana [242], [243]. Sin embargo, algunos trabajos postulan que las paredes celulares de las bacterias se estiran y desfiguran cuando interactúan con superficies texturizadas. Este estiramiento se da en las regiones entre las estructuras, y si es suficiente se produce la ruptura celular y la muerte [244], [245]. Li y colaboradores reportaron que nano y microestructuras aumentan drásticamente el área de contacto de las superficies creando propiedades bactericidas más efectivas que las superficies planas; en donde la eficacia bactericida se ve afectada por la altura de las estructuras, el radio y el espaciado [220].

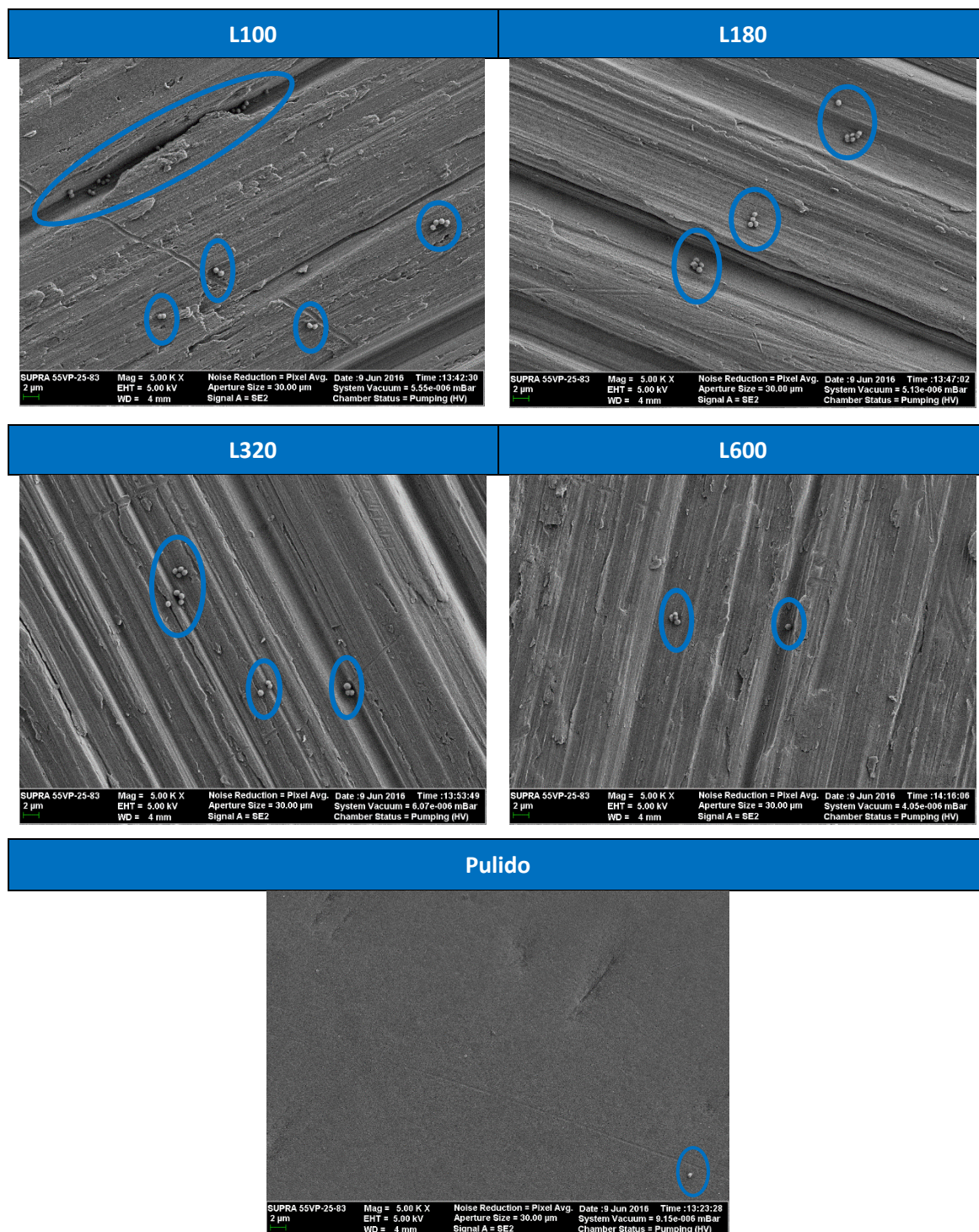


Figura 3. 9. Micrografías SEM de las muestras microacanaladas posterior a la incubación por 24 h a 35°C; a) L100, b) L180, c) L320 y d) L600 y e) pulida con alumina 0,3 µm. Encerradas en círculos se puede distinguir las bacterias adheridas a cada superficie

Harris en su trabajo compara la adhesión bacteriana frente a *S. aureus* de dos superficies de Ti con diferentes rugosidades ($R_a = 0,67$ y $R_a 1,15$ µm) y reporta que existe una diferencia significativa de crecimiento entre ambas muestras en donde la superficie más lisa exhibe mayor adhesión bacteriana [246]. Sin embargo, en una revisión bibliográfica, Bos expuso que la rugosidad superficial parece ser un factor menor en la adhesión de las bacterias a la superficie y que las bacterias raramente presentan una preferencia para adherirse en crestas o valles de una superficie [247]. Esto estaría en concordancia con

nuestros resultados mostrados la figura 3.8 y en las micrografías MEB de la figura 3.9 donde no hay diferencia significativa en la adhesión y crecimiento de microorganismos en las diferentes superficies metálicas. Esto sugiere que la composición química como así también la energía superficial tiene una mayor influencia en la adhesión bacteriana que la topografía de estas superficies [248], [249].

Las imágenes MEB de la figura 3.9 muestran que las bacterias se adhirieron a todas las superficies estudiadas, sin embargo, cabe resaltar que la presencia de microcanales aumenta el área superficial y genera algunos valles en donde las bacterias se “escondan” y podrían volverse focos de infección en un corto plazo con la posibilidad de formación de biofilm si no es controlado mediante algún agente antibiótico a tiempo [250]. Sin embargo, teniendo en cuenta una respuesta celular osteoblástica, se ha reportado que se produce una mejor oseointegración cuando la superficie de contacto con las células posee una rugosidad micrométrica [251]. Razón por la cual se decidió adicionar la propiedad antibacteriana a nuestros sustratos mediante la deposición de un agente inorgánico antibacteriano popular como la plata, lo cual evitaría que las bacterias se adhieran y “escondan” en los valles de los microcanales pudiendo proliferar y desencadenar un proceso infeccioso.

Evaluación del efecto antibacteriano de superficies de titanio microacanaladas, con NT de TiO_2 y con deposición de Np de Ag

Considerando que los microcanales por si solos no poseen una característica antibacteriana en la superficie del Ti, en esta sección se propone depositar nanopartículas de plata en su superficie para demostrar que es posible imponer una propiedad antibacteriana en nuestras muestras.

La figura 3.10 muestra los granos de plata depositados por medio de reducción por UV de AgNO_3 sobre la superficie de una muestra de titanio pulido y posteriormente anodizado a 20V. El tiempo de deposición fue optimizado en función de resultados microbiológicos obtenidos en trabajos previos (no mostrados en esta tesis). Los gránulos observados presentan tamaños variables que van desde las decenas de nanómetros hasta los 200 nm aproximadamente. Las mismas se pueden distinguir en las imágenes MEB fácilmente por su contraste y están remarcadas en círculos rojos.

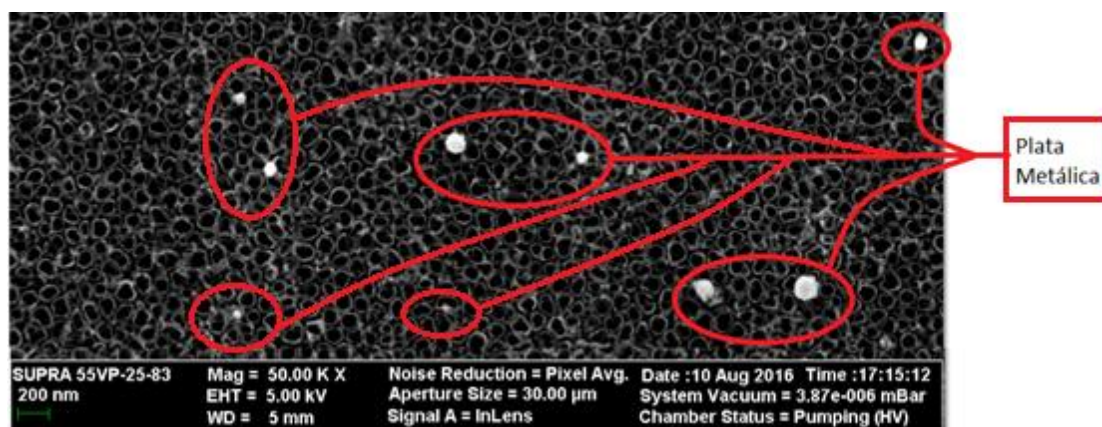
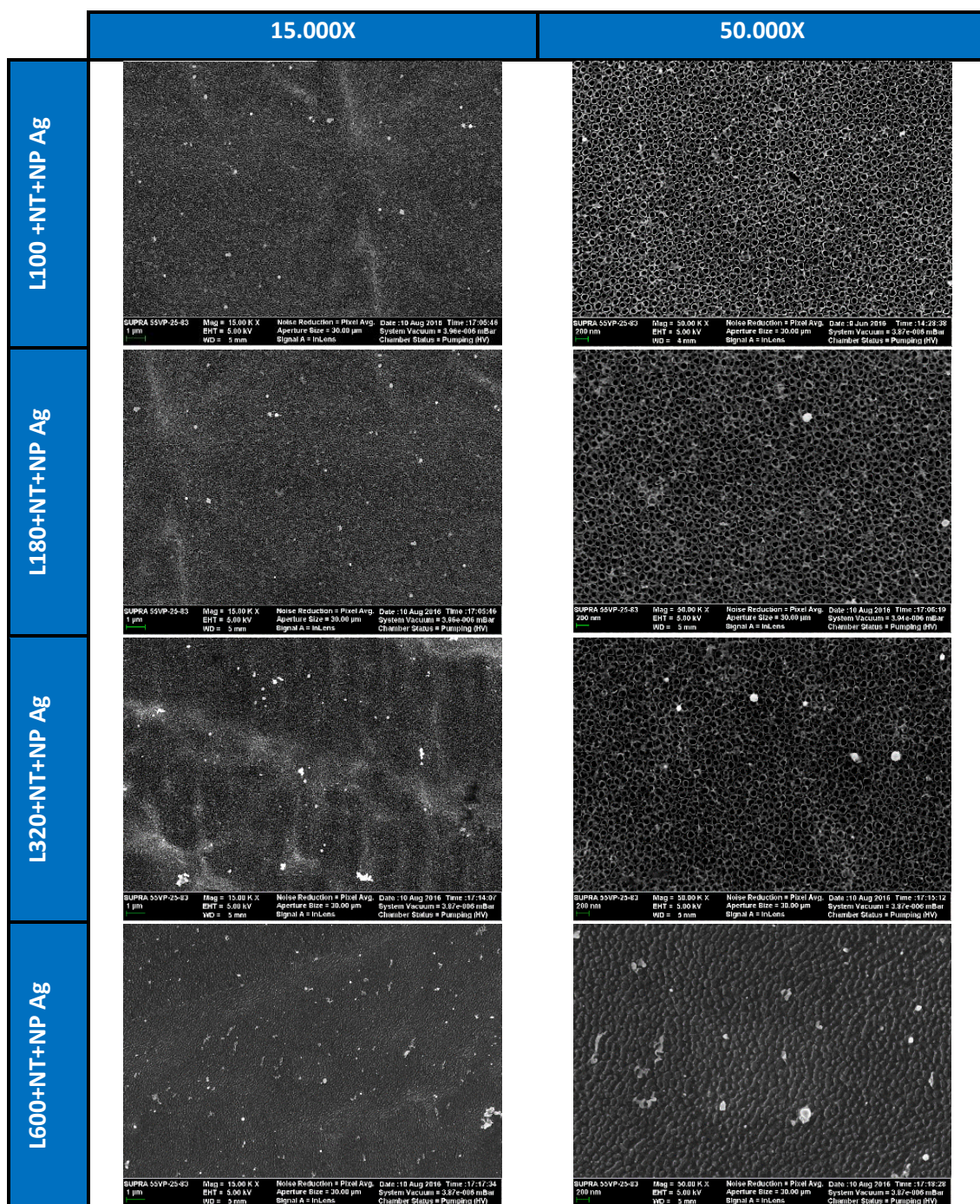


Figura 3. 10. Foto tomada por el MEB de una muestra de Ti pulido anodizado a 20 V y con deposición de plata. En la imagen se observan las partículas de Ag resaltadas en color rojo

En la figura 3.11, se observan muestras de titanio con nanotubos de óxido de titanio y partículas de plata depositadas en su superficie mediante reducción UV. En las imágenes de la izquierda (magnitud 15000X) se aprecia la distribución de las NP de Ag en la superficie de cada muestra de acuerdo con las diferentes granulometrías de lijas usadas; los puntos brillantes se corresponden a partículas de plata.



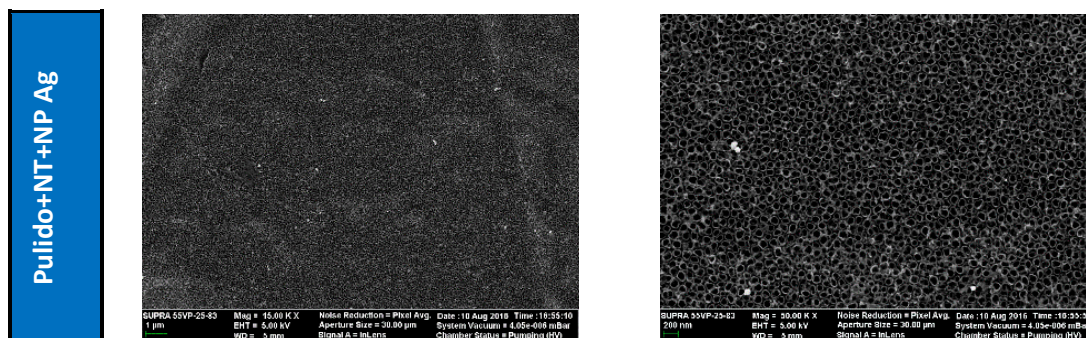


Figura 3. 11. Micrografías del MEB de las muestras microacanaladas con posterior anodizado a 20V y deposición de NP de Ag. Se muestran los grupos diferentes L100, L180, L320, L600 y pulido con alúmina 0,3 micras a distintas magnificaciones. Los depósitos de mayor luminosidad corresponden al elemento plata

Se realizó el análisis composicional de las muestras depositadas con plata y se observó la presencia de Ti, O, F y Ag en todas ellas. A modo representativo se presenta en la figura 3.12 el espectro y composición elemental de una muestra de Ti microacanalado con L180 anodizado a 20V y depositado con NP de Ag por 18 min.

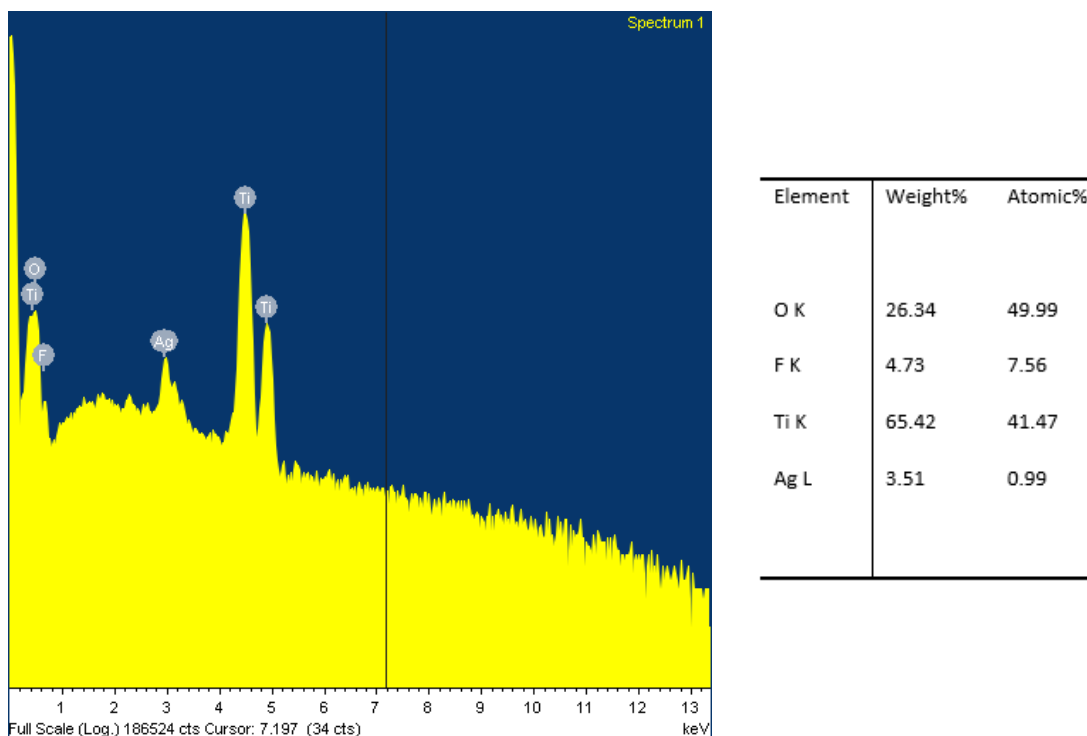


Figura 3. 12. Caracterización composicional de muestras de Ti con microcanales y NT de TiO_2 depositadas con NP de Ag mediante fotoreducción con UV. a) espectro y b) composición elemental en porcentaje en peso y atómico. Se observan Ti, O F (restos del anodizado) y Ag

En la figura 3.12 a) se observan los picos característicos del Ti y del O lo que confirma la presencia TiO_2 en la muestra y además se distingue el pico que corresponde a Ag lo cual verifica que la composición de las nanopartículas depositadas efectivamente corresponde a este elemento. También cabe destacar la presencia del pico característico del F, como ya se mencionó en el capítulo 2, corresponde un producto de residuo de la anodización del sustrato en solución de HF para el crecimiento de los nanotubos. En la figura 3.12 b) se observan las

proporciones de cada elemento en peso y en cantidad de átomos para el sustrato estudiado. La técnica de EDS utiliza un haz de electrones de muy alta energía por lo que los rayos X característicos que se desprenden de la muestra tienen mucha información del volumen irradiado. En este sentido la técnica de EDS es útil para detectar la presencia de Ag depositada sobre los sustratos, sin embargo, no permite determinar la proporción de este elemento respecto del óxido de titanio.

En cuanto a la evaluación microbiológica, una vez en contacto el inóculo con las muestras, el crecimiento de la población bacteriana dependerá de su adaptación al medio y, por ende, del efecto antibacteriano de los especímenes a evaluar. Por esta razón fue necesario adaptar el tiempo de inoculación sugerido por la norma ISO 22.196 a 2 horas. Esto se realizó considerando ensayos previos donde luego de inocular las muestras junto a las bacterias por 24 h se evidenció muy poco o nada de crecimiento bacteriano posterior a las etapas de recuperación e incubación. Estos resultados parciales sugieren que las nanopartículas poseen un alto efecto bacteriano o un efecto repelente potente. Por lo que, para poder analizar los resultados se decidió disminuir la etapa de inoculación a 2 h y analizar el efecto de las nanodeposiciones en las muestras con microcanales.

La figura 3.13 muestra una fotografía de la placa de Petri luego de la incubación, se puede observar como la placa con agar LBM fue dividida en 8 porciones y cada porción representa un resultado triplicado de cada dilución, en este caso particular cada mitad de la placa corresponde a las bacterias inoculadas previamente con una muestra en particular para la cual se observan 3 diluciones (3 porciones) distintas. La mayor dilución fue seleccionada para realizar el conteo de las UFC.

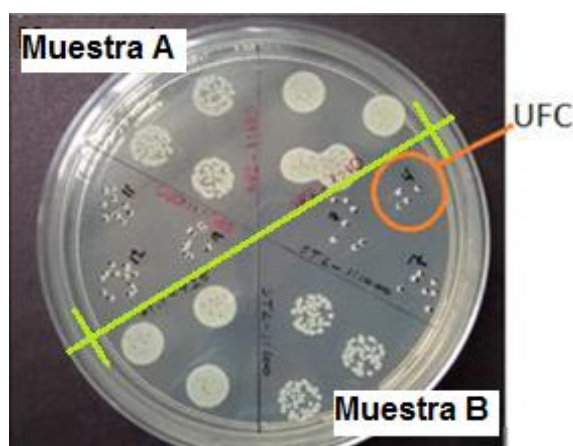


Figura 3. 13. Fotografía de una placa de Petri luego de la etapa de incubación, muestra el número de UFC contadas. El número ideal de conteo debe estar entre 1 a 30 UFC por gota inoculada sobre la placa.

La figura 3.14 muestra los resultados correspondientes a la evaluación del efecto antibacteriano de las muestras con microcanales, anodizadas y con depósito de plata.

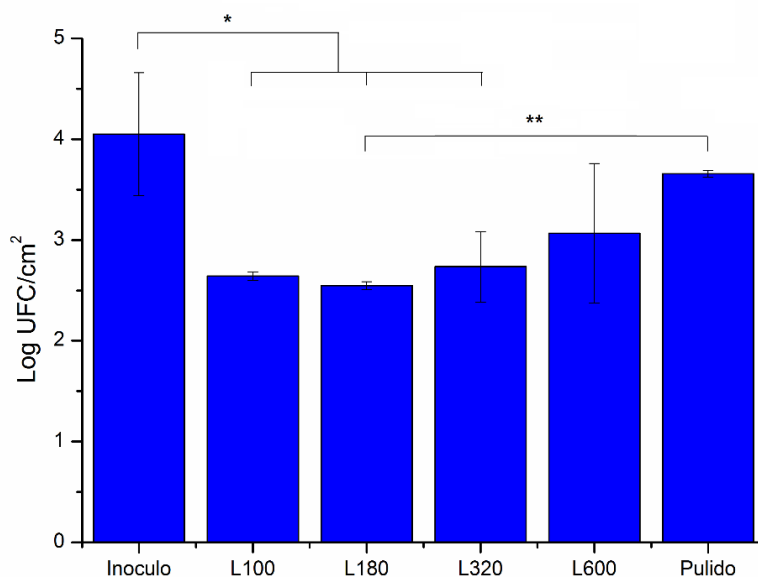


Figura 3. 14. Evaluación del efecto de los microcanales en combinación con los NT de TiO_2 depositados con NP de Ag. Luego de un tiempo de incubación de 2 h se observa una reducción significativa de la población bacteriana entre (*) el inóculo y las muestras L100, L180 y L320; y (**) entre las muestras de Ti pulido y Ti L180 con $p \leq 0,005$

En el gráfico de barras de la figura 3.14 se puede observar que todas las muestras ensayadas presentan una reducción de crecimiento comparado con el inóculo crecido en la placa de agar LBM. De las cuales, las muestras L100, L180 y L320 presentan una diferencia significativa con el inóculo. Esto estaría relacionado a dos razones: 1) Al igual que en el ensayo anterior, sugiere que el medio agar LBM es más apropiado, en un inicio, para el crecimiento bacteriano en comparación con las superficies metálicas; 2) la presencia de las NP está ejerciendo una actividad antibacteriana sobre los microorganismos luego de las dos horas de inoculación.

Por otro lado, comparando los resultados de crecimiento de *S. aureus* sobre el Ti, se puede observar que la superficie de Ti L180 con una rugosidad Ra de $0,73 \mu\text{m}$ presenta una reducción significativa de la carga bacteriana inicial respecto de la superficie de Ti pulido.

Considerando que todas las muestras fueron sometidas al mismo tratamiento de fotoreducción de la plata, es posible justificar este comportamiento con una mayor retención de las partículas de Ag sobre las muestras con mayor rugosidad superficial. Si bien la rugosidad asociada al grupo muestral L180 es de aproximadamente $0,7 \mu\text{m}$ y los diámetros de las NP de Ag pueden alcanzar hasta 200 nm, es decir unas 3,5 veces más pequeñas que la rugosidad media de los microcanales, es posible que las NP de Ag sean retenidas en defectos superficiales más pequeños que los microcanales en sí asociados al abrasivo mecánico utilizado. También, al igual que lo observado en el ensayo anterior donde las bacterias se “escondían” dentro de los microcanales, es posible que las NP queden atrapadas en estos surcos y desde allí ejerzan una mayor actividad antibacteriana repeliendo la adhesión de bacterias en esos “escondites”. Es decir, los canales podrían servir para ejercer una retención mecánica de la Ag, generando una mayor respuesta antibacteriana al compararlo con superficies más pulidas.

Con las imágenes de los sustratos Ti con NP de Ag en magnitud 50 kX se calculó, usando el software ImageJ, el área promedio de las nanopartículas en un área de $23 \mu\text{m}^2$, para el

sustrato pulido y para la muestra L180, ambas con NT de TiO_2 . Se obtuvieron áreas de 614,8 nm^2 y 821,2 nm^2 para las muestras Ti pulida y L180 depositadas por 18 minutos, respectivamente. Esto apoya la hipótesis anterior, que a mayor rugosidad superficial mayor retención mecánica de NP de Ag ya que el aumento en el área de NP de Ag medida para la muestra L180, estaría relacionado con el aumento del número de estas., considerando que el tiempo de deposición es el mismo en ambos casos.

En cuanto a la presencia de los NT de TiO_2 en la superficie, se ha demostrado que rugosidades por debajo de $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ (200 nm) no afectan la adhesión bacteriana [215], [216]. Asimismo, Yoda y colaboradores compararon superficies de Ti c.p con rugosidades menores a 30 nm y no observaron diferencia estadísticamente significativa en la adhesión y crecimiento de S epidermis [250]. Por lo cual no se espera que los nanotubos de TiO_2 en la superficie de nuestras muestras presenten efecto sobre el crecimiento. Sin embargo, sí podrían influir en la retención de las NP de Ag. En nuestros ensayos se utilizaron muestras anodizadas a 20 V resultando en NT con diámetro promedio de 86 ± 12 nm. Considerando los objetivos de este capítulo, solo se analizó un único diámetro de NT, por lo que vale resaltar que sería necesario estudiar la influencia del diámetro en la retención de la Ag. Además, diferentes concentraciones de plata podrían también ser fácilmente estudiadas modificando el tiempo de exposición o la concentración de la solución de AgNO_3 . Según la bibliografía la deposición de las NP dependería del diámetro de los NT de TiO_2 Lan y colaboradores demostraron una mayor actividad biológica en adhesión y proliferación de fibroblastos humanos al igual que una marcada actividad antibacteriana para las muestras con NT de TiO_2 con diámetros de 25 nm decorados con Ag en donde atribuyen este comportamiento a la mayor irregularidad a escala nanométrica dada por las NP de Ag en comparación con diámetros mayores de 50 y 100 nm [252]. A su vez también se ha reportado acerca de la incorporación de NP de Ag en las estructuras nanotubulares resultando en una liberación controlada del ion Ag [234]. Esto está relacionado con una característica inherente a los NT de TiO_2 que es la capacidad para usarse como reservorios de diferentes elementos como por ejemplo agentes antibacterianos [253], [254].

Para mejorar las propiedades antibacterianas de nuestras muestras se ha depositado NP de Ag sobre las muestras con NT de TiO_2 . Sin embargo, hay que tener en cuenta que ciertas dosis de Ag son tóxicas. Diversos estudios han demostrado que la concentración de iones Ag y el tamaño de las nanopartículas de Ag juegan un papel importante en la determinación de su toxicidad. Por ejemplo, Ag^+ puede promover la generación de especies reactivas de oxígeno y daño a las células, mientras que el daño por Ag metálico es menos prominente, lo que sugiere que el estado iónico de Ag es el principal estado tóxico [255]. Sin embargo, las altas concentraciones de nanopartículas de Ag pueden causar toxicidad celular [256]. En nuestro caso, la deposición de plata se realizó para demostrar que nuestros sustratos son aptos para incorporar un agente antibacteriano en su superficie, razón por la cual solo se probó una concentración fija de NP de Ag. Sin embargo, sería necesario corroborar su toxicidad frente a células osteoblásticas. De acuerdo con Li, la presencia de los NT de TiO_2 y su “apertura parcial” en la parte superior de ellos permitiría liberar la plata lentamente lo que reduciría el efecto tóxico de las altas concentraciones en la célula [191]. En nuestro caso las partículas de Ag depositadas podrían presentar dos mecanismos de acción 1) liberando iones Ag que podrían unirse efectivamente a proteínas bacterianas alterando su estructura y función y 2) uniéndose directamente a la membrana celular, también pudiendo penetrar en la célula. Además, se ha reportado que la actividad antibacteriana de las nanopartículas de Ag depende principalmente de su dimensión y forma [238], [257]. Por otro lado, la toxicidad de estas nanopartículas está

actualmente bajo investigación y vale subrayar que pocos estudios sistemáticos se han centrado en las nanopartículas de Ag, a pesar de su aplicación generalizada [258], [259].

3.4. Conclusión

La norma ISO 22.196 se pudo adaptar óptimamente para la realización de ensayos antibacterianos sobre muestras de titanio y titanio con modificaciones superficiales, lo que permitirá realizar futuros ensayos teniendo en cuenta estándares internacionales. El análisis antibacteriano mostró que no existen diferencias apreciables de crecimiento de bacterias *S. aureus* entre las diferentes superficies microacanaladas. Se logró realizar una óptima deposición de NP sobre los NT de TiO_2 en superficies microacanaladas lo cual demuestra que nuestros sustratos pueden ser adecuados y usados en diferentes aplicaciones. Se evidenció que la muestra Ti L180 con NT de TiO_2 y con NP de Ag presenta un efecto antibacteriano respecto del control de Ti pulido luego de sólo 2 horas de incubación del inóculo en contacto con las muestras. La deposición de NP de Ag por fotoreducción demostró ser un método sencillo y fiable para conferir una propiedad antibacteriana a nuestros sustratos

4. Evaluación de la respuesta celular de hFOB frente a nanotubos de titanio

En este capítulo se estudiará la respuesta de osteoblasto frente a las muestras de Ti grado médico modificadas. El tratamiento de modificación superficial está compuesto por geometrías en escala micrométrica, por la presencia de los microcanales y geometrías en escala nanométrica por la presencia de NT de TiO_2 . Para este estudio se realizaron ensayos de proliferación en base a métodos de MTT y de fosfatasa alcalina mediante detección colorimétrica. Se mostrarán también los resultados de las imágenes MEB captadas y se concluirá acerca del comportamiento general.

Abreviaciones

DMEM	Medio Dulbecco-Eagle Modificado
DMF	Dimetilformamida
FA	Fosfatasa Alcalina
HA	Hidroxiapatita
hFOb	Osteoblastos Humanos Fetales
MEB	Microscopía Electrónica de barrido
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCL	Policaprolactona
p-NPP	p-Nitrofenilfosfato
SFB	Suero Fetal Bovino
NT de TiO_2	Nanotubos de TiO_2

4.1. Introducción

El proceso de integración del tejido óseo con el implante precisa de varios meses para lograr un óptimo agarre. La modificación de la rugosidad y el área superficial del implante pueden proporcionar un medio más adecuado para la adsorción de proteínas y el crecimiento celular, acelerando el proceso de regeneración del hueso y mejorando a corto y largo plazo la osteointegración de estos [260]–[262], que de acuerdo a la literatura está influenciado por la topografía y geometría de la superficie [44], [263].

Una gran variedad de propiedades tanto físicas como químicas de la superficie presentan efecto en la interacción del implante sobre el tejido [43]. Diversos estudios han demostrado

que una mayor rugosidad en la microescala de la superficie influye positivamente en la respuesta ósea al implante, debido a la mayor superficie expuesta que mejora el anclaje óseo y el enclavamiento biomecánico entre el implante y el hueso en comparación con superficies lisas.[75], [85], [264]–[266]. Además, se sabe que las nanorugosidades poseen, también, un efecto sobre la respuesta biológica hacia el implante [260], [266]–[268]. Aunque se desconocen los mecanismos exactos, la razón detrás de este efecto es que las características de la superficie a nanoescala aumentan la energía de la superficie, lo que aumenta su humectabilidad y por lo tanto, la propagación y unión de proteínas de fibrina y matriz, conduciendo finalmente a una mayor adhesión celular [266], [269].

Cuando se pone en contacto el Ti con el medio celular, además de las interacciones de los distintos componentes del fluido fisiológico, también tienen lugar los procesos de adhesión, crecimiento y diferenciación de las células presentes en el organismo vivo sobre la superficie del implante. Inmediatamente después de que un biomaterial es implantado en el cuerpo humano, además de las interacciones de la superficie con el agua y los iones, se ponen en marcha una serie de mecanismos de defensa del sistema inmunitario. Los que primero detectan la presencia del implante son los neutrófilos y los macrófagos, seguidos por la formación a partir de los macrófagos activados de células gigantes de cuerpo extraño. A continuación, las células osteoprogenitoras migran a las cercanías del implante, donde se diferencian a osteoblastos, que forman el hueso. La adhesión celular implica un primer contacto con la superficie del biomaterial; posteriormente, la extensión de la célula que va seguida por una secuencia de diferenciación y crecimiento celular. Las células se unen a proteínas adsorbidas a la superficie por medio de moléculas de adhesión transmembrana, a sitios específicos de las proteínas. En orden cronológico, la interacción entre una célula y la superficie se lleva a cabo en diferentes etapas las cuales involucran la modificación de la interfaz, adsorción de proteínas como respuesta a las propiedades físico-químicas de la superficie, interacción de las células con esa capa de proteínas y posterior adhesión y finalmente estructuración del tejido de acuerdo a la capa de células adheridas a la superficie. De esto se observa que la adhesión e interacción inicial de las células es un factor clave en el proceso de osteointegración.

Las respuestas celulares específicas a la superficie del implante implican comportamientos de un sistema biológico complejo, que incluyen adsorción de proteínas, unión receptor-ligando y transducción de señales [270]. Entonces, las relaciones entre las características nano y micro de la superficie y las respuestas celulares son bastante complicadas y están lejos de ser bien entendidas, por lo que aun hoy son objeto de estudio.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las superficies con capas de óxido de titanio con geometría de nanotubos o nanoporos mejoran el crecimiento celular y por ende, el crecimiento óseo [24], [271], [272]. Contrariamente, una baja proliferación ha sido asociada directamente a resultados de osteointegración negativos [273], [274]. Salou et al., realizaron un estudio comparativo de la osteointegración de diferentes acabados superficiales en implantes. Los resultados de los ensayos de tracción, contacto implante-hueso y crecimiento indicaron que las superficies con NT presentan mejor osteointegración en el fémur de conejo comparando con superficies arenadas, con tratamiento de grabado ácido y mecanizadas [262], siendo estos últimos tratamientos superficiales que se realizan actualmente en los implantes comerciales.

Como se enunció en el capítulo 1, la mayoría de los implantes en el mercado presentan superficies rugosas creadas mediante modificación física o química, siendo las más comunes el

arenado y grabado ácido superficial. El rendimiento mejorado de estos implantes se puede asignar principalmente a una mayor estimulación del anclaje óseo, ya que las topografías de superficies rugosas tienen una influencia sobre las células osteogénicas y la activación plaquetaria [275]. Sin embargo, en situaciones en donde los mecanismos biológicos normales están alterados, por ejemplo luego de una cirugía, el sitio de implantación posee baja densidad ósea, baja vascularización o cantidad insuficiente de hueso. Por lo que, lograr una adhesión celular adecuada a la superficie es particularmente importante para lograr un recubrimiento completo de la misma por células del tejido óseo, lo cual directamente ayuda a la osteointegración e indirectamente torna a la superficie menos susceptible a una colonización bacteriana.

De acuerdo con la bibliografía, muchos trabajos sobre el efecto de nanotubos de TiO_2 en la superficie de implantes de Ti han sido reportados, pero la mayoría de ellos fueron realizados estudiando la respuesta de células mesenquimáticas o células preosteoblásticas. De acuerdo con nuestros conocimientos, poco se ha reportado acerca del comportamiento osteoblástico a superficies nanotubulares; por lo que resulta importante realizar esta investigación.

En el presente capítulo se evaluó la respuesta *in vitro* de osteoblastos humanos fetales (hFOB, por sus siglas en inglés) frente a las superficies de Ti modificadas con rugosidades a diferentes escalas, previamente optimizadas en el capítulo 2. Mediante la fabricación de muestras anodizadas a diferentes voltajes y la presencia o no de microcanales se evaluó el efecto del diámetro en la proliferación y expresión de fosfatasa alcalina.

4.2. Materiales y Métodos

Materiales

Para la evaluación *in vitro* de los sustratos fabricados, se cultivaron hFOb obtenidos del American Type Culture Collection (hFOb 1.19, ATCC® CRL-11372™). Para la manutención de la línea celular, se adquirió Medio Dulbecco-Eagle Modificado (DMEM, por sus siglas en inglés), F-12 (mezcla de nutrientes), suero fetal bovino descomplementado (SFB) y L-Glutamina 200mM de Lonza (España). La geneticina y la mezcla Penicilina-Estreptomicina 100X fueron provistos por Sigma Aldrich (España).

La fabricación de los sustratos se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Medios e Interfases (UNT, Argentina) mientras que la evaluación *in vitro* de los mismos fue realizada en el Laboratorio de Inmunología Celular de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la supervisión de la Dra. Isabel Pividori y la Dra. Mercè Martí Ripoll.

Fabricación de las muestras

Para la fabricación de las muestras se tomaron como punto de partida los protocolos previamente optimizados en el Capítulo 2 y resultados parciales del Capítulo 3. A continuación, se detalla brevemente el procedimiento usado.

Los sustratos de Ti fueron cortados en forma cuadrangular de 5 x 5 mm² a partir de una placa de Ti c.p. grado 2 usando una cortadora de precisión montada con un disco de filo diamantado y abundante líquido de refrigeración. Una vez cortadas las muestras los sustratos fueron limpiados sucesivamente en acetona, alcohol isopropílico y agua destilada durante 5 min. Luego fueron contactados eléctricamente e incluidos en resina acrílica. Posteriormente los sustratos fueron pulidos en una pulidora metalográfica de precisión con lijas al agua de SiC de granulometría 320, 600, 1000, 1500 y 2000; y luego pulido con suspensión de alúmina de 1 µm y de 0,3 µm. Seguidamente, dichas muestras fueron separadas en 2 grupos: Grupo I: pulido (muestras pulidas a 0,3 µm) y Grupo II: L180 (muestras con un pulido adicional con lija de granulometría 180 granos/cm²); este último resultando en una superficie de Ti con microcanales. Posteriormente las muestras fueron limpiadas en un sonicador utilizando alcohol isopropílico y agua destilada por 10 minutos para asegurar la remoción de cualquier partícula residual del pulido.

A continuación, todas las muestras fueron anodizadas a diferentes voltajes para lograr NT de diferentes diámetros, por lo que, cada electrodo de Ti fue sumergido en una solución de pulido químico HF 1% y HNO₃ 1% durante 5 min y luego lavado con abundante agua destilada. Para el anodizado electroquímico se empleó una celda electroquímica bipolar, conectando como ánodo el electrodo de Ti y como cátodo una chapa de Pt incluida en acrílico, la separación entre ellos fue ajustada en 1 cm. En esta etapa las condiciones de anodizado fueron: concentración de la solución de trabajo de 0,5 % de HF, voltaje de anodizado de 10V, 15 o 20 V, tiempo de anodizado de 10 min y solución de pulido fresca para cada electrodo de manera de asegurar una correcta limpieza. Inmediatamente luego de cumplirse el tiempo de anodizado se adicionó 1ml de solución de detenimiento de NaOH y posteriormente el electrodo fue lavado con abundante agua destilada. Seguidamente al anodizado las muestras fueron colocadas por 1 h en una solución de limpieza de 0,1M de HCl.

La tabla 4.1 resume las características de las muestras preparadas y estudiadas en este capítulo.

Tabla 4. 1. Muestras utilizadas para ensayo in vitro con células hFOB

Grupo	Muestra	Condiciones
Grupo I	Pul	Control Ti pulido (alumina 0,3 μm)
	Pul NT 10V	Ti pulido + NT DE TiO_2 anodizado 10 V
	Pul NT 15V	Ti pulido + NT DE TiO_2 anodizado 15 V
	Pul NT 20V	Ti pulido + NT DE TiO_2 anodizado 20 V
Grupo II	L180	Control Ti microacanalado (L180)
	L180 NT 10V	Ti L180 + NT DE TiO_2 anodizado 10 V
	L180 NT 15V	Ti L180 + NT DE TiO_2 anodizado 15 V
	L180 NT 20V	Ti L180 + NT DE TiO_2 anodizado 20 V

Cultivo de hFOb

La línea celular hFOb 1.19 fue cultivada en botellas de cultivo de 75cm^2 empleando medio DMEM/F12 (1:1) con 10% de SFB, 1% de Penicilina-Estreptomicina, 0.9% de L-Glutamina 200mM y 0.6% de Geneticina. Tanto la L-Glutamina como la Geneticina fueron agregadas al medio de cultivo justo antes de su uso para así evitar una temprana degradación de las mismas. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 , con cambios de medio cada 3-4 días. Células de pasajes 4 al 6 fueron usadas para los posteriores ensayos.

Para la evaluación de la respuesta celular, las muestras metálicas fueron guardadas de forma individual en sobres de papel para esterilización previamente etiquetados y luego esterilizadas mediante autoclave a 121°C por 15 minutos, de manera de hacer más fácil su manipulación durante el ensayo. Subsecuentemente, las mismas fueron colocadas en una placa de 48 multi pocillos en donde se las dejó sumergidas en medio de cultivo por 2 h para favorecer la adhesión celular. Una vez finalizado este procedimiento, los sustratos fueron retirados del medio y pasados nuevamente a otra placa estéril de 48 pocillos nuevamente para evitar restos de medio en la base del pocillo, siempre dejando expuesta hacia arriba la cara del sustrato modificada.

Una vez confluentes al 80%, las hFOb cultivadas en frascos de 75cm^2 fueron desprendidas añadiendo 1ml de una mezcla de tripsina al 0,25% con 0.1% de EDTA. Las células obtenidas fueron centrifugadas, contadas en una cámara de Neubauer, luego de una realizar una tinción con Azul de Tripiano, sembradas sobre cada muestra con una densidad de 10×10^3 células/ cm^2 e incubadas a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO_2 para así facilitar el crecimiento celular, proliferación y mineralización. La siembra se realizó poniendo una gota de 30 μl sobre cada muestra previamente seca por 2 h para promover la adhesión de las células en el sustrato. Pasadas las 2 h, se añadió medio de 480 μl cultivo. Como control del procedimiento de cultivo en sí, en todos los ensayos se cultivaron células hFOB directamente en pocillo de poliestireno (10×10^3 células/ cm^2 , placa multipozos de 48 pocillos) y pocillos sin células, únicamente con medio.

Evaluación de la proliferación celular

La proliferación celular sobre los distintos scaffolds fue determinada colorimétricamente empleando el kit Vybrant® MTT (Life Technologies, Estados Unidos). En células metabólicamente activas, este ensayo implica la reducción de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en cristales insolubles de formazán mediante enzimas mitocondriales succinato-deshidrogenasas. Las sales de formazán producidas son posteriormente solubilizadas y medidas ópticamente a 570nm.

Luego de incubar las células durante 3, 7 y 14 días los scaffolds a analizar fueron enjuagados con PBS -acorde a las instrucciones del proveedor- para remover las células no adheridas y posteriormente incubados en medio fresco con MTT 0,05% durante 4 horas a 37°C. Las sales de formazán formadas fueron solubilizadas luego mediante incubación de los scaffolds a 37°C durante 18 horas en dodecilsulfato sódico. Finalmente, se midió absorbancia a 570nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas modelo TECAN Sunrise complementado con el software de análisis Magellan v4.0 (Tecan Group Ltd, Suiza).

Medición de actividad de fosfatasa alcalina

La actividad de la fosfatasa alcalina (FA) fue determinada colorimétricamente mediante exposición de la enzima a p-nitrofenilfosfato (pNPP), sustrato de la misma. La expresión de actividad de FA es un indicador de la capacidad de los hFOb para mineralizar la matriz ósea una vez sembrados sobre las diferentes muestras. Durante esta reacción la FA cataliza la hidrólisis de pNPP -un fosfato inorgánico incoloro- en un producto amarillo -p-nitrofenol- y fosfato.

A partir de los lisados celulares se realizó la medida de FA para cultivos de 3, 7 y 14 días, los cuales fueron inicialmente enjuagados con PBS. Para la determinación de la actividad de FA de lisados celulares, se mezclaron 50 µl de cada muestra con 250 µl de una solución de 10 mM p-NPP (Sigma Aldrich, España) disueltos en tampón DEA (pH 9.8, 1M dietil etanolamina, 0.5mM MgCl₂). Inmediatamente después, se siguió la reacción midiendo la absorbancia a 405 nm cada 30 segundos usando un lector de microplacas (Infinite Pro200, Tecan, Austria). Finalmente, la actividad de ALP se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta Abs}{min} \frac{1}{18.5} \frac{1}{CO} \frac{VT}{VM} = FA_{Act}$$

Donde $\Delta Abs/min$ corresponde a la pendiente de reacción de regresión lineal, 18.5 (ml mol⁻¹ cm⁻¹) es el coeficiente de absorción molar del p-nitrofenol a 405 nm en tampón DEA a 25°C, CO (cm) es el camino óptico recorrido, VT es el volumen total y VM es el volumen de la muestra.

Los resultados fueron normalizados respecto a las proteínas totales de los lisados a partir de un kit de medición de proteínas BCA (Pierce™, Thermo Fisher, España), donde se utilizaron 25 µl de cada muestra junto con 200 µl de reactivo y albúmina para realizar una curva de calibración de proteínas, posteriormente se mide la absorbancia a 562 nm en un lector de placa.

Microscopía Electrónica de Barrido de hFOb

Se evaluaron morfológicamente los hFOb cultivados in vitro sobre los diferentes scaffolds mediante MEB luego de 10 días de cultivo. Para ello, las muestras fueron enjuagadas dos veces con PBS para luego ser fijadas durante al menos 1 hora con una solución de glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 2% disuelto en tampón fosfato (PB, por sus siglas en inglés).

Seguidamente, las muestras fueron enjuagadas dos veces con PB para luego ser deshidratadas con soluciones de etanol en concentración creciente (50%, 70%, 90%, 96% y 100%) durante 10 minutos en cada una. Inmediatamente luego de la someter las muestras a etanol absoluto, las mismas fueron secadas empleando un secador por punto crítico (Bal-Tec CPD030, Liechtenstein). Por último, las muestras fueron recubiertas con una nanopelícula de platino mediante sputtering (Polaroid E5000, Estados Unidos) para luego ser observadas bajo una tensión de aceleración de 15 kV en un microscopio electrónico de barrido modelo Zeiss EVO MA 10 (Carl Zeiss NTS GmbH, Alemania) perteneciente al Servicio de Microscopía de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Análisis de humectabilidad: medición del ángulo de contacto

Se evaluó la humectabilidad de los sustratos determinando el ángulo de contacto de agua destilada sobre las superficies de las muestras acorde a la técnica de la gota sésil bajo condiciones ambientales ordinarias. Para ello, se diseñó un sistema montado en nuestro laboratorio que consiste en una cámara fotográfica, un difusor de luz y una fuente de luz, se muestra un esquema del sistema en la figura 4.1.

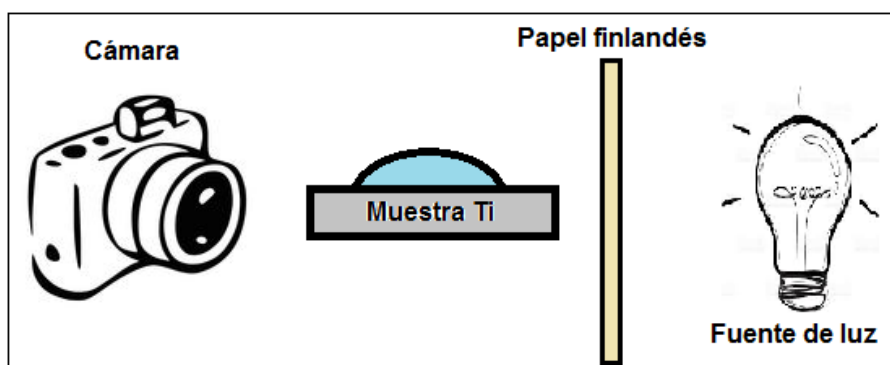


Figura 4. 1. Esquema del sistema de medición de ángulo de contacto montado en el laboratorio. Para la difusión de la luz, se utilizó papel Finlandés.

La cámara del sistema montado fue tipo CMOS con una distancia focal de 28 mm y resolución de 8 MP. Como difusor de luz se utilizó papel Finlandés, acorde a recomendaciones del Lic. Benjamín Felice, especialista en dirección de fotografía. La fuente de luz consistió en una bombilla de luz incandescente de 40 W. Las gotas de agua destilada fueron dispensadas mediante una micropipeta automática de 1-10 μL .

Las muestras fabricadas fueron colocadas sobre una superficie plana entre la fuente de luz y la cámara. Gotas de agua destilada de 6 μL -acorde a lo recomendado por el estándar DIN ISO 55660-2 fueron dispensadas sobre la superficie de las muestras utilizando la micropipeta. La imagen del ángulo de contacto entre cada gota y la superficie en cuestión fue registrada 5 segundos después de haber dispensado la gota. Las imágenes obtenidas fueron pre-procesadas utilizando el software de procesamiento de imágenes Image J (National Institute of Health, Estados Unidos) para luego ser analizadas mediante el software de análisis SCA 20 (Dataphysics Instruments, Alemania). Con este último, en cada imagen, primero se determinó la línea de base y subsecuentemente se interpoló el contorno de la gota de acuerdo con el método Young-Laplace para luego finalmente medir el ángulo de contacto. Tres gotas sobre cada muestra fueron registradas y evaluadas. Al menos tres especímenes de cada tipo de muestra fueron evaluados.

Análisis Estadístico

Los datos se presentan en términos de valor promedio \pm desviación estándar. Para comparar los promedios de más de tres grupos de datos, se aplicó un Análisis Simple de Varianza (One-Way ANOVA) en combinación con evaluaciones post-hoc tipo Tukey HSD. La evaluación de la igualdad de varianza en todos los casos se realizó mediante el test de Levene con un nivel de significación de 0.05. En caso de varianzas desiguales, se aplicó el test de Welch. Para comparación directa de dos poblaciones de datos, se empleó la prueba t de Student para pares grupos de datos independientes. El nivel de significancia se reporta en cada ensayo.

Ensayo realizado

- *Evaluación del efecto de muestras microacanaladas L180 y muestras pulidas con diferentes diámetros de NT de TiO₂ en la respuesta de hFOB*

La evaluación del efecto de los diferentes diámetros de NT de TiO₂, fabricados sobre una superficie de Ti pulida (alumina 0,3 μm) y sobre una superficie de Ti lijado L180 (lija granulometría 180 granos/cm²) en la respuesta de hFOB fue realizada. Para lograr diferentes diámetros de NT el voltaje de anodizado fue variado y se utilizaron 10, 15 y 20V. En cada ensayo se adicionó como muestra control un sustrato de Ti pulido sin anodizar y una muestra L180 sin anodizar. El protocolo de cultivo empleado se describió previamente en este capítulo.

4.3. Resultados y Discusión

La topografía de las muestras juega un rol importante en la regulación inicial de la adhesión y proliferación celular. La respuesta de las células hFOB fue evaluada en este capítulo frente a diferentes rugosidades micro y nanométricas. Las primeras varían entre superficies con una rugosidad media de 0,085 μm (muestras Ti pulido, con pulido final con pasta de alumina 0,3 μm) y muestras con rugosidad media de 0,73 μm (muestras del grupo L180 con pulido final de lija granulometría 180 granos/cm²). En cuanto a la topografía nanométrica, nuestras muestras poseen diferentes diámetros de NT de TiO₂ que fueron logrados mediante diferentes voltajes de anodizado, a saber: 10V, 15V y 20V. La tabla 4.2 resume los valores de Ra para la rugosidad micrométrica y los valores de los diámetros promedios para la rugosidad nanométrica de las muestras, caracterizados previamente en el capítulo 2. La figura 4.2 muestra de forma comparativa las microfotografías de las superficies de sustratos pulidos a 0,3 μm y muestras L180, con y sin NT de TiO₂, en este caso la anodización se realizó a 20V. Obsérvese como la presencia de NT en la superficie altera levemente la rugosidad micrométrica.

Tabla 4. 2. Caracterización de la topografía de los sustratos usados en ensayo in vitro con hFOB

Grupo	Muestra	Características	
		Ra (μm)	Diámetro NT (nm)
Grupo I	Pul	0,085 \pm 0,09	0
	Pul NT 10V		34,3 \pm 8,1
	Pul NT 15V	0,12 \pm 0,08	51,5 \pm 8,2
	Pul NT 20V		86,1 \pm 12,7
	L180	0,73 \pm 0,09	0
Grupo II	L180 NT 10V		36,7 \pm 7,6
	L180 NT 15V	0,78 \pm 0,12	60,1 \pm 4,2
	L180 NT 20V		93,1 \pm 9,7

Las mediciones de rugosidad realizadas con el rugosímetro corroboran que cuando una muestra es anodizada y se fabrican NT de TiO_2 en la superficie, no solo la rugosidad en la nano escala es modificada sino, también, la rugosidad en la microescala. Se observa que las muestras pulidas con alumina $0,3 \mu\text{m}$ dieron un valor de R_a : $0,085 \mu\text{m}$ y las muestras anodizadas resultaron en un mayor valor de R_a : $0,12 \mu\text{m}$. Lo mismo se observó para para el grupo II en donde las muestras L180 sin anodizar dieron R_a : $0,73 \mu\text{m}$ y las anodizadas mostraron un valor aumentado de R_a : $0,78 \mu\text{m}$. Vale recalcar que las mediciones de la rugosidad micrométrica no mostraron diferencias significativas entre mediciones dentro de un mismo grupo, es decir el proceso de anodizado a voltajes entre 10 y 20V permite variar el diámetro de apertura de los NT, pero no altera así la rugosidad a escala micrométrica. Estos resultados son corroborados cualitativamente observando las micrografías MEB de la figura 4.2 en donde se pueden apreciar las diferentes rugosidades dadas por la fabricación de microcanales y por la fabricación de la capa nanotubular.

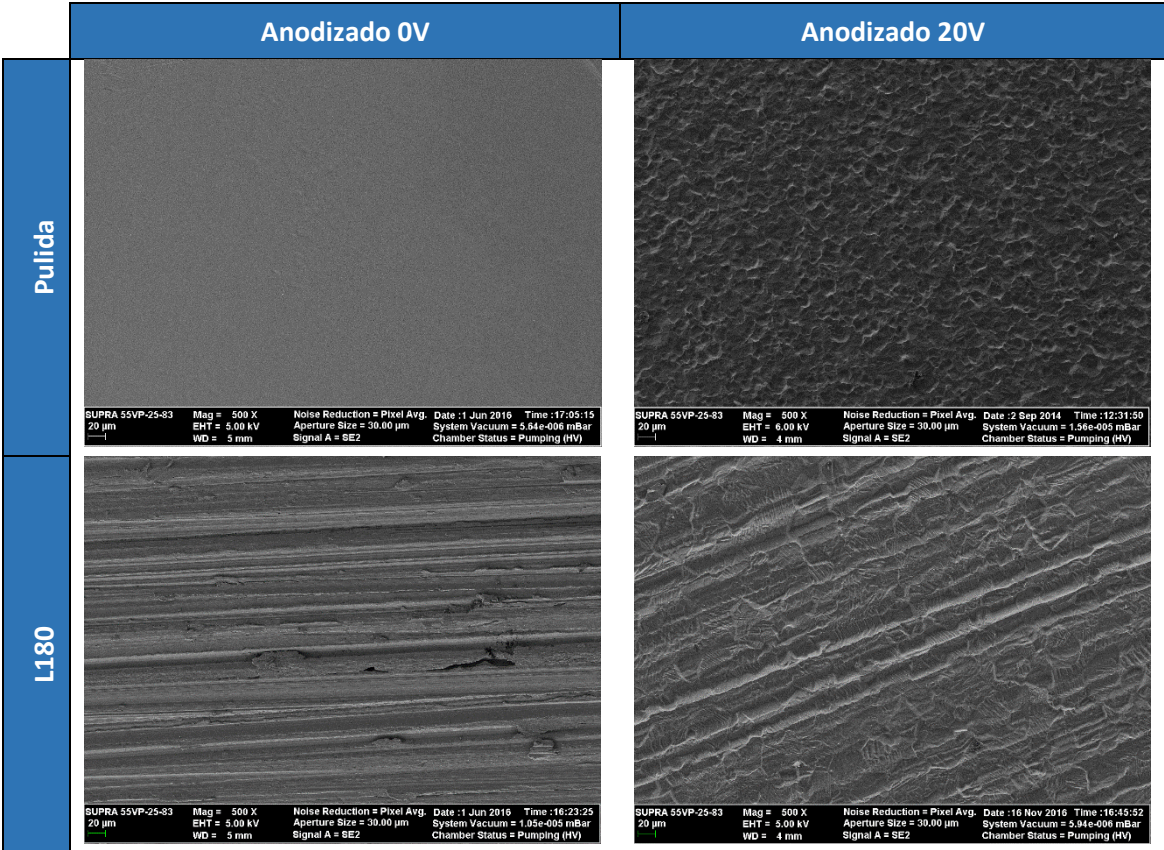


Figura 4. 2. Diferentes rugosidades en escala micro y nanométrica para muestras sin y con microcanales (L180) y muestras sin y con anodizado a 20V

Proliferación celular

La proliferación de las hFOB evaluada mediante ensayo de MTT a los 3, 7 y 14 días sobre las muestras fabricadas, se muestra en la figura 4.3. Como se observa, la gráfica de la izquierda muestra la variación en el tiempo de la proliferación para las muestras con NT de TiO_2 fabricados sobre una superficie pulida. La gráfica de la derecha muestra las mismas variables para muestras anodizadas sobre sustratos con microcanales de L180. En ambos casos se agrega un control Ti pulido y Ti L180 sin anodizar, respectivamente.

Para todos los casos es evidente el aumento de la proliferación a través del tiempo. Si se observa el gráfico del grupo I, se puede distinguir que el crecimiento de las células está aumentado en las muestras con NT de TiO_2 respecto del Ti pulido para cada periodo, sin embargo, solo la muestra Pul NT 15V para el día 7 y las muestras con NT, para el día 14, presentan diferencia significativa ($p \leq 0,05$) respecto del control. También, observando los valores de proliferación en función del tiempo, se puede ver un crecimiento tipo exponencial para los casos de las muestras con NT de TiO_2 .

Considerando, por otro lado, sólo el efecto de los nanotubos sobre muestras sin microcanales inducidos por lijado, se ve que las muestras con nanotubos inducen un incremento significativo de la proliferación celular, siendo el grupo de muestras con NT obtenidos a 15V el que parece inducir relativamente mayor proliferación celular a comparación de las muestras restantes sólo con NT. Repitiendo el análisis en función de los NT obtenidos pero sobre muestras previamente lijadas, se puede observar claramente que el efecto de los microcanales predomina por sobre el efecto de la nanorugosidad introducida por los nanotubos. Esto está en concordancia por lo estudiado por Andrukhov et al, los cuales demostraron que, a mayor tamaño de rugosidades, mayor es la proliferación. Dado que las superficies sólo con nanotubos representan una nanorugosidad frente a las muestras microrugosas, se puede considerar que lo expuesto por Andrukhov et al., se aplica en este caso [3].

Observando el gráfico del grupo II, el comportamiento de las células en las muestras con microcanales es similar al descrito anteriormente, pero aún más marcado para el caso de superficies nanoestructuradas. Para el período de 3 y 14 días se observa una diferencia significativa en la proliferación en las muestras Ti L180 10 V y Ti L180 15V en comparación con el control de L180 del mismo periodo, respectivamente ($p \leq 0,05$). A su vez también se realizó una comparación cruzada con el control de Ti pulido del Grupo I, en donde se observó que todas las muestras poseen una mayor proliferación ($p \leq 0,05$), para los tres periodos evaluados. Asimismo, para el día 14 las muestras con microcanales y NT presentan un aumento de la proliferación entre 3 y 4 veces comparada con la proliferación en la muestra control de Ti pulido. Inclusive para el día 14 se observa una diferencia significativa en la proliferación para los NT de diferentes diámetros, observándose mayor proliferación en las muestras L180 15V y L180 20V en comparación con L180 10V del mismo período. Ya se demostró que un valor de voltaje de anodizado mayor está relacionado con un mayor diámetro de NT, por lo que en términos generales de acuerdo con la figura 4.3, una mayor proliferación está relacionada con un mayor diámetro de los NT. Todo lo anterior sugiere la existencia de un efecto sinérgico entre las dos arquitecturas superficiales a micro y nano escala.

Al comparar el grupo sin L180 frente al grupo con L180, se observa claramente que la presencia de microcanales incrementa significativamente la proliferación celular. Acorde a Cheng et al, Hewet et al y Andrukhov et al., [276]–[278] se debe probablemente a que el tamaño de los canales ronda el orden de las micras, como se pudo determinar anteriormente mediante rugosimetría (Capítulo 2). Esto implica que las microcanales poseen el mismo orden que el tamaño osteoblástico promedio ($\approx 10\mu\text{m}$), induciendo así una mayor adhesión celular y por ende, mayor proliferación.

La proliferación aumentada estaría relacionada con una mayor hidrofiliidad de las células con NT lo que está en acuerdo con la literatura en donde se demostró que superficies hidrofílicas pueden mejorar la unión celular y proliferación [107], [279] más que las superficies hidrofóbicas. Además de las propiedades de la superficie como el área de contacto y la

humectabilidad, Feng et al. [280] confirmaron que los grupos funcionales químicos están fuertemente asociados con el comportamiento de los osteoblastos, por lo que en nuestro caso, las superficies nanotubulares de TiO₂ podrían promover el crecimiento y la proliferación celular debido a la mayor cantidad de grupo hidroxilos [280]–[282].

Además, de acuerdo a los resultados, se puede observar que la estimulación de crecimiento celular es mayor cuando las células se cultivan en titanio nanoestructurado, se ve claramente que los osteoblastos responden a una rugosidad a nanoescala.

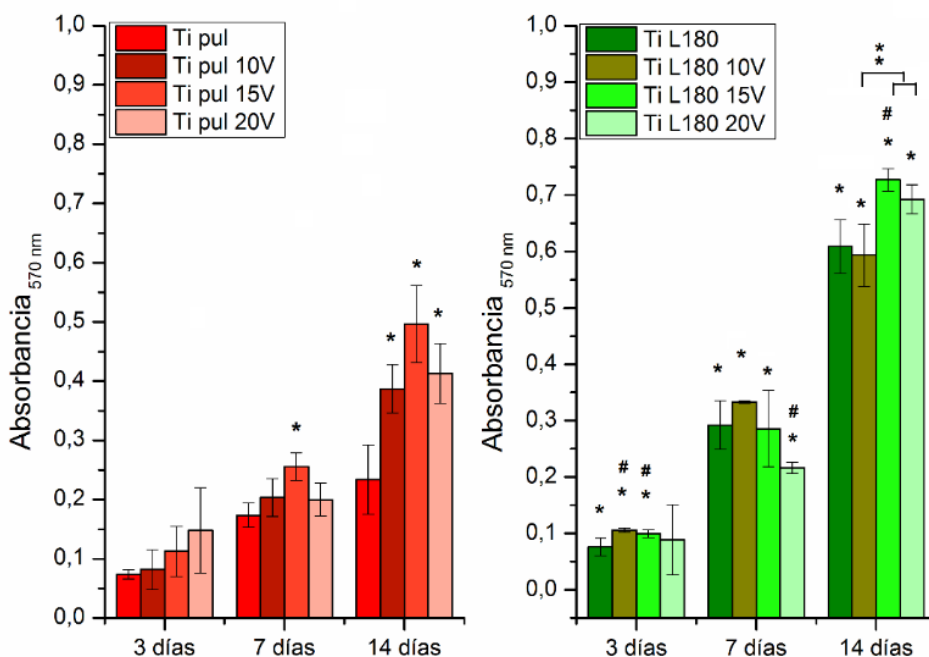


Figura 4. 3. Proliferación de hFOB sobre sustratos metálicos. Proliferación de hFOB sobre: a) Grupo I: Ti pulido y Ti pulido con NT de TiO₂ anodizados a 10V, 15V y 20V; y b) Grupo II: Ti microacanalado y Ti microacanalado con NT de TiO₂ a 10V, 15V y 20V, determinada mediante ensayo de MTT. *Significación estadística frente a proliferación celular sobre Ti pulido durante el mismo periodo de cultivo ($p \leq 0.05$), #Significación estadística frente a proliferación celular sobre Ti microacanalado (L180) durante el mismo periodo de cultivo ($p \leq 0.5$), ** Significación estadística frente a proliferación celular sobre Ti microacanalado con NT de TiO₂ ($p \leq 0.5$)

Actividad de la fosfatasa alcalina

La actividad de la FA de hFOB cultivados durante 3, 7 y 14 días sobre muestras de Ti con y sin microcanales y con diferentes diámetros de NT de TiO₂ o falta de ellos, se muestra en la figura 4.4. Se observa inicialmente una expresión de FA por parte de las hFOB en las distintas muestras para el día 3, sin embargo, luego todos los niveles de actividad de FA disminuyen con el tiempo. Para el día 7 y 14 se observa una expresión de FA sostenida en función del tiempo. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en su actividad para ningún grupo muestral.

Una tendencia similar en la disminución de la FA con el tiempo también fue observada por MacBarb et al., para superficies porosas recubiertas con plasma de Ti [283] y por Qiao et al., para superficies de Ti con NT recubiertos con HA [284], en ambos casos la disminución de la FA

se observa para el día 14, sin embargo, ninguno de ellos elucida en sus trabajos una posible razón.

La FA es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. El incremento de su actividad es un marcador clave para el inicio de la mineralización celular [285]–[287]. Considerando la proliferación registrada sobre las distintas muestras en combinación con lo sugerido por Donahue et al., respecto a que la estabilización de los niveles de proliferación junto a un incremento de la actividad de la actividad de FA son indicadores de inicialización de la mineralización, estos resultados sugieren que todavía no se inició la etapa de mineralización por parte de las hFOB sobre nuestras muestras [288]. Más aun, la disminución de los niveles de FA estaría relacionado al gran aumento de la proliferación inducido por nuestras superficies para los días 7 y 14; ya que la gráfica de la figura 4.4 presenta los valores de FA normalizada respecto a proteínas totales, por lo que una mayor proliferación se traduce en una mayor cantidad de proteínas totales para un tiempo dado y por ende un menor valor de FA normalizado.

Sin embargo, se sabe que la expresión de FA en células osteoblásticas está íntimamente relacionada con la activación de diferentes receptores que modulan, mediante mecanismos de señalización, diferentes procesos en la formación de hueso [289], como por ejemplo, la activación de receptores P2 están relacionados con la proliferación [290] y con la inhibición de la mineralización en osteoblastos [291], [292]. Rodrigues-Ribeiro et al., estudiaron los procesos de diferenciación de células preosteoblasticas MC3T3-E1 para 7 y 14 días y demostraron el rol de estos receptores P2 en la diferenciación a osteoblastos en un período de 7 días y en la inhibición de la actividad de FA para el día 14 [289], observando así una disminución en los valores .

Por lo que, de acuerdo con nuestros resultados, los estímulos mecánicos a los que están expuestas las células podría gatillar la activación de diferentes receptores promoviendo la proliferación e inhibiendo la mineralización en una primera etapa. Las células hFOB probablemente no alcanzaron el inicio de la fase de mineralización, considerando que no llegaron a mostrar una relación “proliferación constante-ALP creciente”, que según Owen es un indicador de disparo de la mineralización [293].

Contrariamente, la literatura muestra mayormente que la presencia de NT de TiO₂ en la superficie promueve un aumento de la FA en función del tiempo. Más aun, Xia et al., investigaron el efecto *in vitro* de micro y nano rugosidades de implantes de titanio en la osteogénesis demostrando que las superficies nanotubulares aumentan la proliferación y los niveles de actividad de FA comparando con superficies microrugosas [294]. Esto sostiene nuestra hipótesis ya que se observa una relación directa entre las características de superficie y la activación de diferentes respuestas celulares.

Los resultados aquí analizados muestran, contrariamente a lo expuesto por Owen [293], que proliferación fue creciente entre los días 3 a 14 mientras que la ALP se mantuvo relativamente constante para periodos entre 7 y 14 días. Considerando esto, se puede concluir que las muestras en un periodo de 14 días no comenzaron a mineralizar dado el gran predominio del efecto positivo de la rugosidad sobre la proliferación celular. Se debe destacar que esto no implica que etapas tardías de cultivo, las muestras aquí analizadas no hubieran entrado en fase de mineralización.

Análisis cualitativo mediante microscopia electrónica de barrido

La determinación de la morfología celular de las hFOB cultivadas durante 12 días sobre los especímenes de estudio fue realizada mediante MEB. Se realizó un análisis microscópico visual, recorriendo las muestras con un MEB para concluir cualitativamente sobre la densidad de células en la superficie. La inspección visual sugiere que las muestras con nanotubos y microcanales fueron más favorables para la adhesión celular y el crecimiento comparado con las muestras de Ti pulido. En esta muestra control de Ti pulido se observaron zonas sin crecimiento donde podía distinguirse la superficie de la muestra. La figura 4.5 muestra imágenes representativas del comportamiento celular en cada superficie estudiada, en el recuadro interior es posible observar a menor magnificación la capa de células recubriendo dichos sustratos. Asimismo, la figura 4.5 permite apreciar los depósitos minerales sobre las células, lo que estaría sugiriendo un inicio de una etapa de mineralización, los mismos están marcados con flechas.

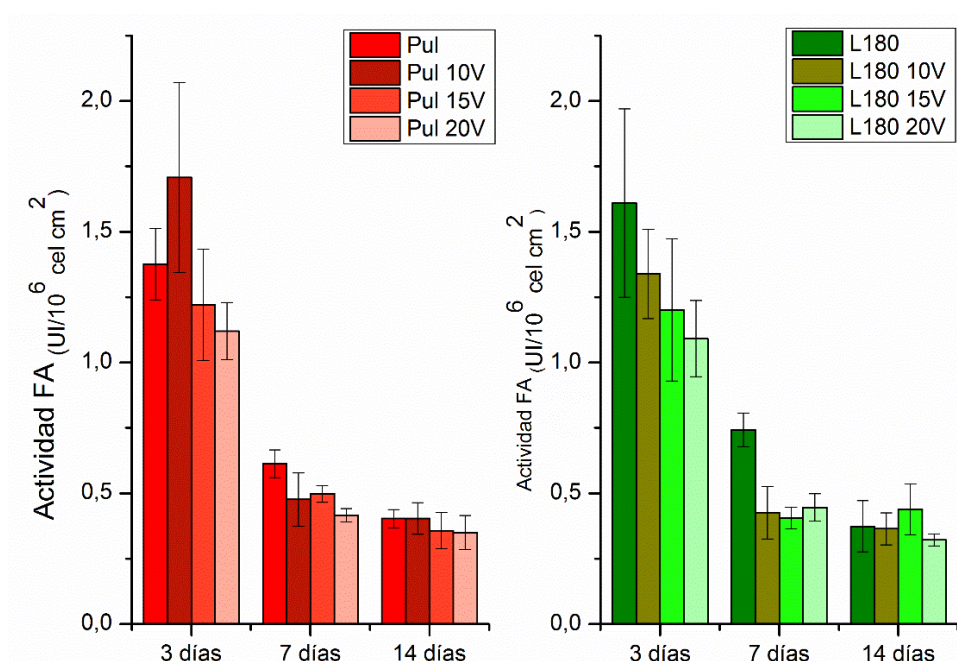


Figura 4. 4 Actividad de la FA de células hFOB sobre muestras metálicas. Actividad de FA de células hFOB sobre a) Grupo I: Ti pulido y Ti pulido con NT de TiO₂ anodizados a 10V, 15V y 20V; y b) Grupo II: Ti microacanalado y Ti microacanalado con NT de TiO₂ a 10V, 15V y 20V, determinada mediante ensayo colorimétrico

Se observa en las imágenes de muestras con NT que las células se encuentran adheridas a los sustratos presentando conexiones entre ellas y con el sustrato mediante filopodios. La muestra Ti pulido sin NT evidenció algunas áreas sin células, sin embargo, los demás sustratos mostraron una gran cantidad de células en toda su superficie las cuales se conectaron y superpusieron de manera significativa quedando completamente cubiertas por una lámina continua de células.

La proliferación de los osteoblastos es un prerequisite para la formación de hueso [295]. Un mayor número de células en la interfaz del implante nanoestructurado puede contribuir al aumento del número celular debido a un mecanismo de respuesta topográfico. Considerando los resultados del ensayo de MTT se podría inferir que la presencia de las nanorugosidades permitió aumentar la cantidad inicial de células adheridas. Esta hipótesis estaría respaldada por la mayor proliferación en las muestras con NT y en las imágenes de MEB de la figura 4.6 en

donde se observan los filopodios de las células dentro de los NT de mayor diámetro. Se ha reportado que las superficies nanoestructuradas pueden atraer osteoblastos o células mesenquimales gracias a su alta afinidad y biocompatibilidad [296]. Si embargo si no existe un óptimo agarre o adhesión inicial en la superficie de los implantes, no existirá una apropiada respuesta biológica por lo que el organismo responderá encapsulando al implante con tejido fibroso, dando como resultado un bajo nivel de unión química con el hueso preexistente.

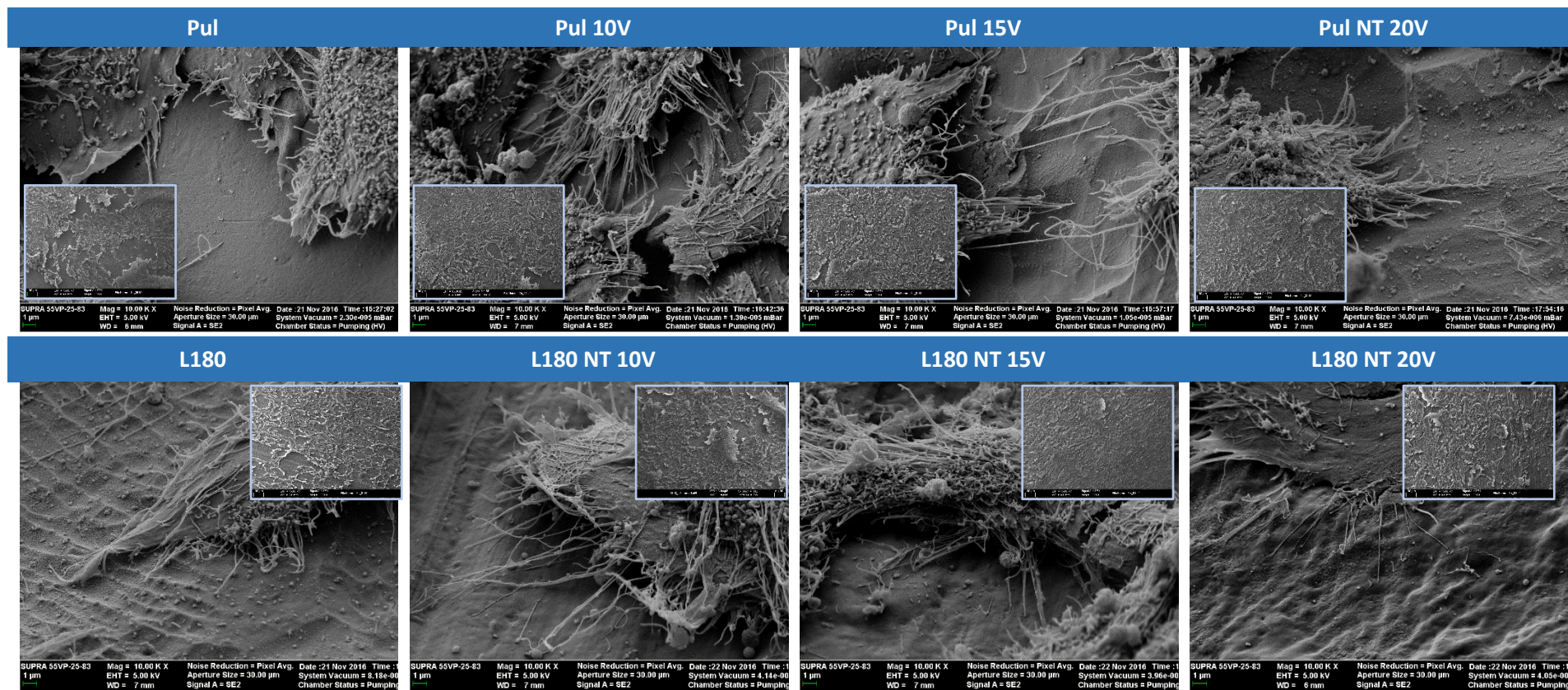


Figura 4. 5. Microfotografías de las células hFOB sobre las muestras metálicas estudiadas

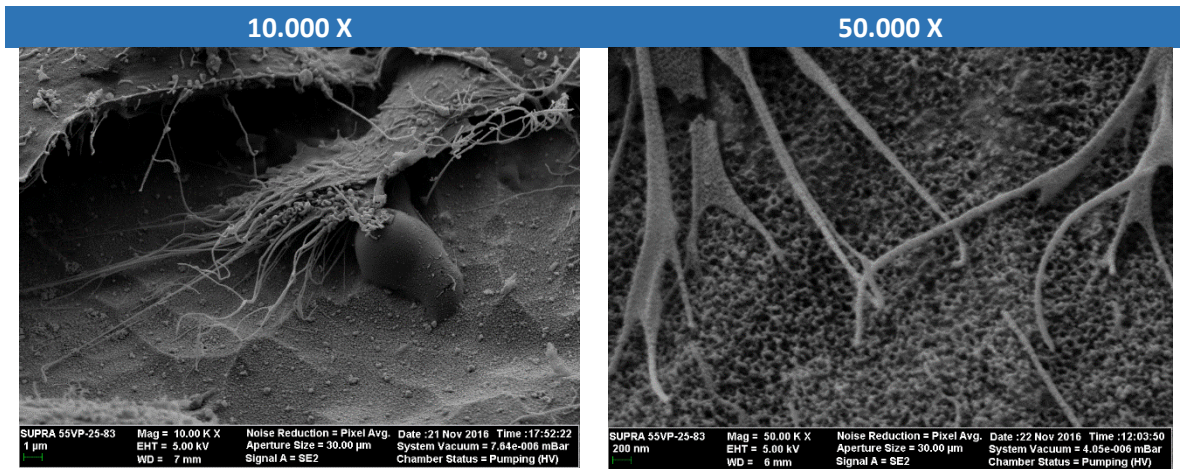
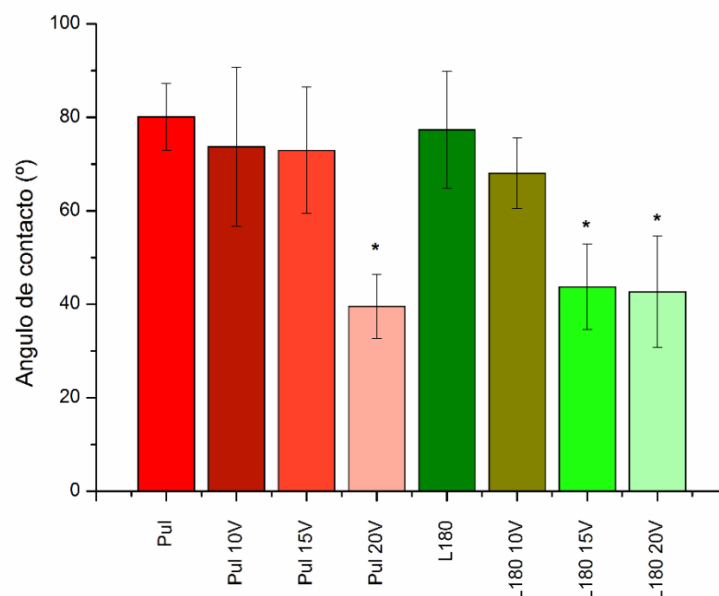


Figura 4. 6. Interacción entre los filopodios de las hFOB y las estructuras nanotubulares

Por otro lado, la adherencia inicial de células está facilitada por la mayor humectabilidad de las muestras y se traduce en una mayor proliferación celular la cual a su vez es incrementada por la mayor rugosidad tanto a micro y nanoescala y sugieren un mejor agarre por parte de los filopodios a la estructura nanotubular lo que facilitaría la osteointegración. La figura 4.7 muestra el ángulo de contacto y soporta esta hipótesis en nuestras muestras, se observa un menor ángulo es decir mayor humectabilidad cuando las nanoestructuras tubulares están presentes.

El efecto mejorado de los dos tipos de rugosidades también puede explicarse de acuerdo con las microfotografías de las células sobre los sustratos. Pues la microrugosidad en forma de microcanales aumentaría el número de células adheridas considerando que posee una rugosidad comparable con el tamaño de las bacterias; y la existencia de NT en la superficie induciría la penetración de los filopodios celulares tal como se observó, lo que permitirían un mejor agarre y anclaje de los osteoblastos, requerimiento necesario para una óptima neoformación ósea en su estadio inicial.



4.4. Conclusión

En particular se pudo demostrar cómo la rugosidad en escala nanométrica y micrométrica influye en el comportamiento de las células osteoblásticas. La capa nanotubular fabricada y optimizada por medio de los parámetros de anodizado produjo pequeños cambios a nivel microscópico pudiendo ser evaluados mediante el parámetro de rugosidad media. A su vez, se demostró que las muestras con modificaciones en ambas escalas, tanto micrométricas como nanométricas, poseen la capacidad de acelerar la proliferación de células osteoblásticas y disminuir la expresión de FA, como resultado de una respuesta celular a la superficie. La presencia de los NT es clave para aumentar la proliferación presentando una superficie más amigable que podría brindar un soporte para un agarre mecánico de los filopodios celulares al sustrato, sugiriendo una mejor adhesión celular y consecuentemente una proliferación aumentada. También, se evidenció que el diámetro de los nanotubos influye en las capacidades de crecimiento celular. Por ello, los resultados indicarían que los sustratos de Ti con superficie modificada mediante microcanales y con nanoestructuras tubulares poseen óptimas propiedades para ser utilizados en implantes médicos.

5. Nanotubos de TiO_2 recubiertos con hidroxiapatita nanoestructurada

En este capítulo se detalla la obtención y caracterización de recubrimientos de fosfato cálcico sobre sustratos de Ti con NT de TiO_2 sobre su superficie. Primero se describen los métodos más comúnmente usados para la deposición de fosfatos cálcicos, y luego se particulariza en la técnica de electrodeposición, haciendo hincapié en la electrodeposición pulsada en modo galvanostático, como un método para la deposición de material en escala nanométrica. Seguidamente se presentan el sistema experimental y materiales empleados, los resultados obtenidos y las conclusiones de este capítulo.

Abreviaciones

ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología
CE	Contra-electrodo de una celda electroquímica
EDS	Espectrometría de dispersión de energía de rayos X
EPD	Deposición electroforética
HA	Hidroxiapatita
I	Corriente
J_a	Densidad de corriente de pulso anódico
J_c	Densidad de corriente de pulso catódico
n_a	Número de pulsos anódicos
n_c	Número de pulsos catódicos
n_{off}	Número de pausas
NT de TiO_2	Nanotubos de dióxido de titanio
REF	Electrodo de referencia de una celda electroquímica
RF	Radiofrecuencia
s	segundos
t_a	Tiempo de duración del pulso anódico
t_c	Tiempo de duración del pulso catódico
t_{off}	Tiempo de pausa
WE	Electrodo de trabajo de una celda electroquímica

5.1. Introducción

Como ya se mencionó en el capítulo 2 acerca de la biología del tejido óseo, el hueso humano consiste en un 20% de fibras de colágeno, 69% de una fase inorgánica cristalina de tamaño nanométrico y un 9% de contenido de agua [297], [298]. Estos compuestos cristalinos nanométricos en su mayoría consisten en HA $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2]$, un tipo específico de fosfato cálcico cuyas dimensiones estructurales son similares en morfología a una barra o aguja con una longitud de 40-60 nm, ancho 10-20 nm y grosor de 1-3 nm [299]. Su característica de ser osteoconductiva y su gran afinidad para crear uniones y enlaces rápidos con huesos vecinos, la convierten un material muy utilizado en la reparación o sustitución artificial ósea; ya que acelera, mediante los procesos convencionales de señalización celular, la adsorción de proteínas de la matriz extracelular, para después producirse la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos alrededor del material [300].

Los recubrimientos de HA o variaciones de ella han tomado gran importancia actualmente en el campo de los implantes y más aún en la era de la nanotecnología. Si bien los materiales con los que están hechos los implantes médicos no son biotóxicos, en su mayoría tampoco son bioactivos, por lo que resulta importante realizar una modificación en ellos para mejorar la respuesta y crecimiento del hueso. Este biocerámico posee una composición química similar al tejido óseo natural [301]–[303] y se integra rápidamente en el cuerpo humano, uniéndose al hueso y permitiendo el crecimiento de éste por aposición con una unión fuerte de tipo epitaxial; más aún, evitando la formación de la capsula fibrosa alrededor del implante una vez implantado [304], [305]. Sin embargo, debido a las pobres propiedades mecánicas de la HA como un cuerpo sólido, tales como fragilidad, baja resistencia a la tracción y dificultades en la fabricación, su principal uso es en forma de polvo para relleno óseo en tratamientos dentales, recubrimientos de implantes dentales y ortopédicos y como sustratos para liberación controlada de drogas [303].

Muchas investigaciones se han realizado en los últimos años en referencia a diferentes métodos de deposición de HA en la superficie del Ti para lograr una mejor fuerza de unión, fácil formación, adecuada densidad y excelente resistencia a la corrosión de los fluidos corporales [306]. Entre los métodos más comunes para la deposición de HA sobre implantes metálicos podemos mencionar plasma *spray* o pulverización de plasma, deposición catódica por radiofrecuencia, sol-gel, deposición electroforética, *dip coating* y deposición electroquímica [307].

La tabla 5.1 muestra un resumen de cada uno de ellos y las ventajas (V) y desventajas (D) relacionadas a cada método.

De todos ellos, solo dos métodos son utilizados actualmente para el recubrimiento de HA en implantes médicos comerciales dado que satisfacen la normativa reglamentaria provista por Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) a nivel nacional para ser considerado un producto apto de uso médico; los mismos son plasma *spray* y deposición electroquímica. En la actualidad, plasma *spray* es el método por excelencia ampliamente utilizado a nivel mundial para el recubrimiento de HA sobre implantes médicos comerciales, sin embargo, presenta ciertas limitaciones tales como pobre adhesión entre el recubrimiento y el sustrato, cambios de fase debidos a la exposición a altas temperaturas (temperaturas mayores a 9000°C), falta de uniformidad en la densidad del revestimiento y control microestructural inadecuado, los cuales podrían resultar en la falla del sistema implantado [313].

Tabla 5. 1. Métodos más comunes para la deposición de HA

Método de deposición	ANMAT	Condiciones	Ventajas/Desventajas
Plasma spray [300]	x	Plasma de fosfato de calcio acelerado con gas inerte	V: las propiedades del metal no se alteran D: baja adhesión y recubrimiento con cambios microestructurales debido a las altas temperaturas, posee stress residual. Fases no uniformes de HA y alto gasto energético (Temp >9000°C)
EPD [308]	-	Partículas en suspensión son direccionadas por un campo eléctrico hacia el sustrato	V: bajo costo, espesores controlables D: baja adhesión, aparición de grietas debido al stress. Posible corrosión y delaminación debido a la porosidad, formación de grietas. Requiere tratamiento térmico
Dip coating [309]	-	Inmersión del sustrato en una solución con la composición química del recubrimiento	V: recubrimientos con espesores controlados, independiente de la forma del sustrato D: requiere altas temperaturas de sinterizado posteriores que pueden producir fallas y fracturas
Deposición catódica por RF [310]	-	Desprendimiento del material desde un blanco y eyección al sustrato	V: Depósitos homogéneos de alta adhesión D: muy baja cristalinidad (aumenta la tasa de disolución en el recubrimiento)
Sol-gel [311]		Transformación química de un líquido (sol) a un estado de gel con subsecuentes tratamientos térmicos para formar un sólido	V: Depósitos densos, uniformes y delgados, microestructura y composición química fácilmente controlable. Fuerte adhesión
Deposición electroquímica [312]	x	Consiste en la deposición de un sólido en uno de los electrodos a partir de una reacción redox electroquímica	V: Proceso simple a baja temperatura y bajo costo. Depósitos homogéneos controlados por parámetros electroquímicos

V: Ventaja, D: Desventaja

Asimismo, se debe tener en cuenta que la velocidad de formación del recubrimiento de fosfato de calcio es alta lo que produce grietas en la capa debido al pobre choque térmico que presentan los materiales cerámicos. Como es bien conocido, los materiales cerámicos son frágiles y no son capaces de absorber energía en su estructura, este hecho hace que los cambios de volumen y tensiones internas producidos en la solidificación del fosfato de calcio no puedan ser absorbidos y se generen grietas en la superficie del material lo que hace aumentar la fragilidad del recubrimiento.

Por otro lado, el método de electrodeposición, también aprobado por la ANMAT es un proceso relativamente económico y funciona a baja temperatura, razón por la cual los cambios de fase no deseados pueden ser evitados. Permite además depositar formas complejas y controlar fácilmente el espesor del recubrimiento, a la vez que presenta alta resistencia a la corrosión y alta biocompatibilidad [307]. Sin embargo, se ha reportado que cuando la superficie del Ti no es tratada previamente a la deposición, la fuerza de adhesión del recubrimiento al sustrato es relativamente baja, condición que fue resuelta por Kar al depositar HA sobre Ti previamente anodizado mostrando que la presencia de NT de TiO_2 imparte una mayor fuerza de unión con el cerámico [313], [314].

Electrodeposición

La electrodeposición es un proceso electroquímico empleado en el tratamiento de superficies. Se basa en el paso de la corriente eléctrica entre dos electrodos inmersos en un líquido conductor (electrolito) originando una reacción redox. Se desarrolla habitualmente mediante la elección de una disolución electrolítica que contiene los cationes constituyentes del compuesto a sintetizar y que serán depositados (simultánea o secuencialmente en función del proceso seleccionado) sobre la superficie de un electrodo (metálico, semiconductor o parcialmente metálico). En consecuencia, se forma una película en la que la mezcla de los elementos se realiza a escala atómica.

El proceso de electrodeposición involucra la formación de una nueva fase sobre el sustrato, lo que implica la participación de una serie de etapas relacionadas con el transporte de materia, la transferencia de carga y la formación de nuevas estructuras cristalinas. Además, en una celda de electrodeposición intervienen muchas variables experimentales que influyen en la eficiencia del proceso y en la composición, morfología, estructural y propiedades de los depósitos. Entre ellos destacan la densidad de corriente, la temperatura, el pH, la composición del electrolito, la disposición y estado superficial de los electrodos y otros parámetros adicionales que hacen que el estudio y control de este tipo de procesos sea complejo [315].

Componentes del proceso de electrodeposición

Una celda electrolítica es una celda electroquímica en la cual se convierte la energía eléctrica en energía química. En este tipo de celda el electrodo que se comporta como ánodo está cargado positivamente y electrodo que se comporta como cátodo está cargado negativamente. La geometría de la celda electrolítica influirá en la distribución de la corriente y el potencial, así como el rendimiento espacio-tiempo del proceso. La configuración más simple es la celda tripolar tipo tanque esquematizada en la figura 5.1 en la cual se utilizan tres electrodos: electrodo de trabajo (WE), contra-electrodo (CE) y electrodo de referencia (REF) inmersos en un electrolito (disolución).

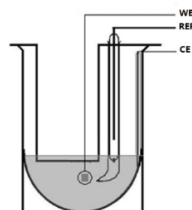


Figura 5. 1. Celda electrolítica tripolar. CE: contra-electrodo, REF: electrodo de referencia y WE: electrodo de trabajo

A continuación, se detallan los elementos involucrados en el sistema de deposición electroquímica

- Electrodo de referencia (REF): Su función es la de controlar el potencial del electrodo de trabajo, y se caracteriza por poseer un potencial constante y conocido. El electrodo de plata-cloruro de plata (Ag/AgCl) es el más utilizado por su fácil construcción y por poseer un intervalo de temperatura de operabilidad alto ($\sim 130^{\circ}\text{C}$).
- Electrodo de trabajo (WE): Es aquel en el cual ocurre la reacción electroquímica de interés en la celda electroquímica. Un WE debe ser un conductor eléctrico y actuar como una fuente o depósito de electrones por intercambio de moléculas en la interfaz electrodo-solución.
- Contra-electrodo (CE): El electrodo auxiliar o contra-electrodo se utiliza para que la corriente que se origina en la celda electroquímica pase a través de este y el electrodo de trabajo, y no por el electrodo de referencia, para evitar su polarización. Para conseguir esto, la superficie de este electrodo debe ser mayor que la del electrodo de trabajo. Los materiales que generalmente se emplean para este electrodo son el platino, grafito y acero inoxidable.
- Electrolito: La química de los electrolitos utilizados en electrodeposición no depende únicamente de la concentración de iones electroactivos (aquellos que intervienen en la reacción de reducción y se incorporan al sustrato). Hay muchos compuestos químicos que se añaden a la disolución para mejorar las propiedades del electrolito y del material electrodepositado tales como ácidos y bases para regular el pH y sales para aumentar la conductividad, entre otros.
- Fuente de alimentación (Potenciostato/Galvanostato): Aporta el potencial o la intensidad necesaria para la electrodeposición.
- Sistema de calefacción: Permite mantener constante la temperatura de disolución.

Tipos de electrodeposición

Existen dos formas de proceder a la hora de llevar a cabo la electrodeposición:

- Deposición directa (DC):
- Potenciostática: Se polariza el electrodo de trabajo a un potencial determinado respecto al electrodo de referencia.
- Galvanostática: Se impone una densidad de corriente determinada, lo que significa controlar la velocidad de reacción.
- Deposición pulsante: se aplican pulsos periódicos de la señal (corriente o potencial). Se pueden diferenciar dos tipos:
 - Pulsos unipolares: todos los pulsos se aplican en la misma dirección, sin inversión de polaridad
 - Pulsos bipolares: se combinan pulsos catódicos y anódicos.

Electrodeposición pulsada galvanostática

La electrodeposición mediante pulsos de corriente consiste esencialmente en una interrupción y/o inversión controlada y periódica de la corriente aplicada durante la electrodeposición, ver figura 5.2.

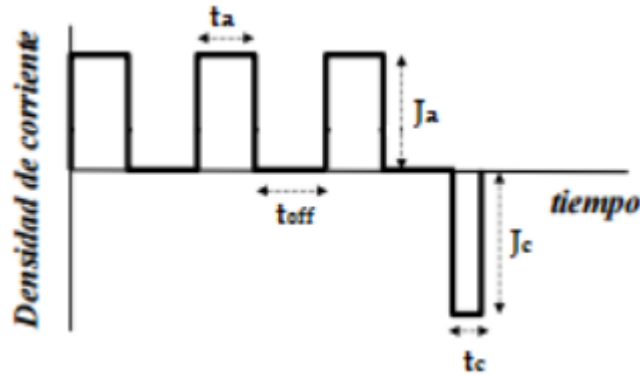


Figura 5. 2.. Esquema de una secuencia bipolar de pulsos de corriente

Los parámetros necesarios para describir una secuencia de pulsos genérica, que se encuentran descriptos esquemáticamente en la figura 3.2, son los siguientes:

J_a : densidad de corriente de pulso anódico	J_c : densidad de corriente de pulso catódico
t_a : tiempo de duración del pulso anódico	t_c : tiempo de duración del pulso catódico
n_a : número de pulsos anódicos	n_c : número de pulsos catódicos
t_{off} : tiempo de pausa	n_{off} : número de pausas

En la electrodeposición convencional mediante corriente continua únicamente puede modificarse un parámetro, el valor de la corriente. Ello dificulta la superación de las limitaciones inherentes al proceso de electrodeposición como las reacciones paralelas (evolución de hidrógeno, formación de hidróxido, reducciones, etc.) que disminuyen la eficiencia de corriente y afectan a la estructura de los depósitos y los efectos del transporte de masa (densidad de corriente límite invariable en el tiempo). Sin embargo, en la deposición pulsante de corriente se dispone de un mayor número de parámetros eléctricos y se pueden diseñar infinitas combinaciones posibles de los mismos, lo que permite modificar la composición, estructura, morfología y propiedades de los depósitos.

Los métodos electroquímicos son ampliamente utilizados para la preparación de películas delgadas y recubrimientos en aplicaciones biomédicas [316]. En los últimos años, se ha realizado una cantidad significativa de trabajos sobre revestimientos electroquímicos de HA sobre implantes metálicos biocompatibles. La mayoría de los autores emplean la deposición catódica, ya que es conocido que los altos potenciales anódicos pueden afectar negativamente a la superficie del sustrato [317]. Esta técnica se realiza a menudo a partir de soluciones acuosas con precursores de calcio y fosfato[318] y comúnmente se emplea platino o grafito como material anódico estándar. La deposición de HA por este método tiene ventajas únicas debido a que es un proceso rápido y puede ser operado a temperaturas relativamente bajas [319]. Las técnicas convencionales que a menudo se utilizan son el modo potencioestático (potencial constante) y el galvanostático (corriente constante) [317], aunque según la bibliografía consultada, estas podrían conducir a la formación de un revestimiento no uniforme [320]. Esto se debe a que durante el proceso la reacción de reducción del agua forma una gran cantidad de burbujas de hidrógeno las cuales podrían adherirse al sustrato y evitar la nucleación y deposición de fosfatos cálcicos. Para superar estas imperfecciones, [321] introdujeron la electrodeposición pulsada, la cual reduciría la

intensidad de la reacción del hidrógeno y contribuiría a una difusión más uniforme de los iones hacia el sustrato. Además, [322] informó que la electrodeposición pulsada galvanostática de HA sobre titanio, mejora la adhesión de los recubrimientos en comparación con la densidad de corriente continua.

Kar [314] realizó recubrimientos de HA sobre NT de TiO_2 mediante electrodeposición pulsada en un fluido corporal simulado ($1.67 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4 + 2.5 \text{ mM CaCl}_2 + 0.15 \text{ M NaCl}$), originalmente propuesto por Ban [323]. Antes de la electrodeposición, la superficie de TiO_2 nanotubular fue sometida a un tratamiento alcalino, que proporcionó una plantilla para la nucleación de la HA sobre los nanotubos. Este proceso dio como resultado un crecimiento vertical de los cristales de HA y aumentó la resistencia de unión del recubrimiento. Además, se ha demostrado que la sinterización a alta temperatura (recocido) crea un revestimiento de CaP más denso y uniforme después de la electrodeposición, con mayores propiedades de adhesión [324].

Chen fabricó revestimientos bioactivos de HA / TiO_2 en andamios microporosos de Ti, mediante electrodeposición pulsada e investigaron la influencia de la densidad de corriente, el tiempo de deposición y el modo de transferencia de masa sobre la morfología, espesor y uniformidad del revestimiento; llegando a la conclusión de que estos tres parámetros afectan notablemente las propiedades del recubrimiento de HA [4]. Demostrando que esta técnica no solo es apropiada para producir sedimentos uniformes, sino también que con ella se puede conservar la topografía original de los sustratos.

Por todo esto, en este capítulo se pretende demostrar como los sustratos de Ti anodizado fabricados y detallados en capítulos anteriores son sustratos apropiados para la deposición y formación de un recubrimiento de HA con una morfología y composición similar al hueso humano. La electrodeposición de HA se llevó a cabo en sustratos de Ti grado médico modificados en su superficie con la formación de nanotubos de TiO_2 por anodizado electroquímico a 20 V, 10 minutos y con una solución de trabajo de 0,5% de HF. Se sabe que las propiedades químicas, estructurales y morfológicas de la HA son muy sensibles a cambios en las propiedades físicas, composición química y temperatura de procesamiento [325]. Utilizando una corriente con forma de onda pulsada, se estudió el efecto de la temperatura y el tiempo de duración del pulso en el crecimiento de los recubrimientos de fosfato cálcico. También se estudiaron las características morfológicas de los recubrimientos obtenidos.

5.2. Materiales y Métodos

Preparación de los sustratos de Ti con NT de TiO_2

Las muestras preparadas en este capítulo se realizaron a partir de resultados parciales obtenidos en el capítulo 2. A continuación se detalla brevemente la preparación de los sustratos para este ensayo. Se tomó como punto de partida los electrodos contactados eléctricamente e incluidos individualmente en resina acrílica dejando solo una cara expuesta pulida con pasta de alúmina de 1 micra. Inicialmente cada electrodo de Ti fue sumergido en una solución de pulido químico HF 1% y HNO_3 1% durante 5 min y luego lavado con abundante agua destilada. Para el anodizado se empleó una celda electroquímica bipolar, un electrolito de 0,5% HF, un voltaje de 20 V, distancia entre electrodos de 1 cm y tiempo de anodizado de 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron limpiadas por 1 h en una solución de 0,1M de HCl y seguidamente almacenados en un recipiente de agua destilada hasta 1 hora antes de realizar el experimento.

Preparación de las soluciones

Las soluciones se prepararon con reactivos químicos de laboratorio momentos antes de realizar el experimento. A saber, dos soluciones:

(a) Solución de tratamiento alcalino: solución 0,5 M de hidróxido de sodio (NaOH, perlitas pro-análisis, Laboratorios Ciccarelli, Santa Fe, Argentina)

(b) Solución de trabajo: solución 1,67 mM de fosfato dipotásico (K_2HPO_4 , pro-análisis, Laboratorios Ciccarelli, Santa Fe, Argentina) con 2,5 mM de cloruro de calcio (CaCl_2 , perlitas pro-análisis, Laboratorios Ciccarelli, Santa Fe, Argentina), a la cual se adicionó 0,1 M de cloruro de potasio como electrolito soporte (KCl, pro-análisis, Biopack, Buenos Aires, Argentina), para dar un pH final de 7,2.

Todas las soluciones fueron preparadas con agua destilada obtenida de destilador eléctrico (Tecno Dalvo S.R.L., LAMEIN- UNT, Tucumán) y agitadas a 200 rpm con un agitador magnético (Arcano MCR, Buenos Aires, Argentina) hasta la disolución completa de los solutos. Estos últimos fueron pesados utilizando una balanza analítica (Denver Instruments, New York, USA) y una granataria (ACCULAB, New York, USA).

Tratamiento alcalino

El electrodo previamente anodizado fue sumergido en la solución 0,5 M de NaOH a una temperatura de 50 °C durante 2 min. El objetivo de este procedimiento es crear un anillo de titanato de sodio alrededor del cuello de los nanotubos el cual sería eficaz para la nucleación de apatita y favorecería la adherencia del recubrimiento [314].

Electrodeposición pulsada galvanostática

Para la deposición de fosfatos cálcicos se utilizó una configuración tripolar con un CE de acero inoxidable en forma de lámina enrollada de 50 cm² de área, un electrodo de Ag/AgCl KCl saturado (Hanna instruments, Italia), como referencia y un electrodo de Ti grado médico con NT de TiO_2 en su superficie, como electrodo de trabajo. La solución con precursores de fosfatos y calcio fue

colocada en un balón de destilación de tres bocas (IVA, CABA, Argentina) que sirvió como celda electroquímica.

Además, se usó una manta calefactora para balón (Arcano MCR, Buenos Aires, Argentina) de manera de poder controlar la temperatura experimental y un refrigerante tipo Graham para condensar los vapores del electrolito y controlar así la concentración de la solución de trabajo. Las figuras 5.3 a) y b) muestran un esquema y la real disposición de la configuración utilizada para llevar a cabo el experimento, respectivamente. La deposición se efectuó con pulsos periódicos de corriente de acuerdo con el ciclo mostrado en la figura 5.4. El ciclo se compone de un pulso de corriente catódico con su correspondiente tiempo de deposición (t_c) y una corriente base con el correspondiente tiempo de pausa (t_{off}). La secuencia de pulsos de corriente se llevó a cabo con una cantidad fija de ciclos ($n=200$) que fueron proporcionados por un galvanostato/potenciostato Solartron 12508W (Solartron Analytical, UK), éste último compuesto por un analizador electroquímico Solartron 1287 y un analizador de respuesta en frecuencia Solartron 1250, controlado por el programa CorrWare (versión 3.5b, SAI, EE. UU.).

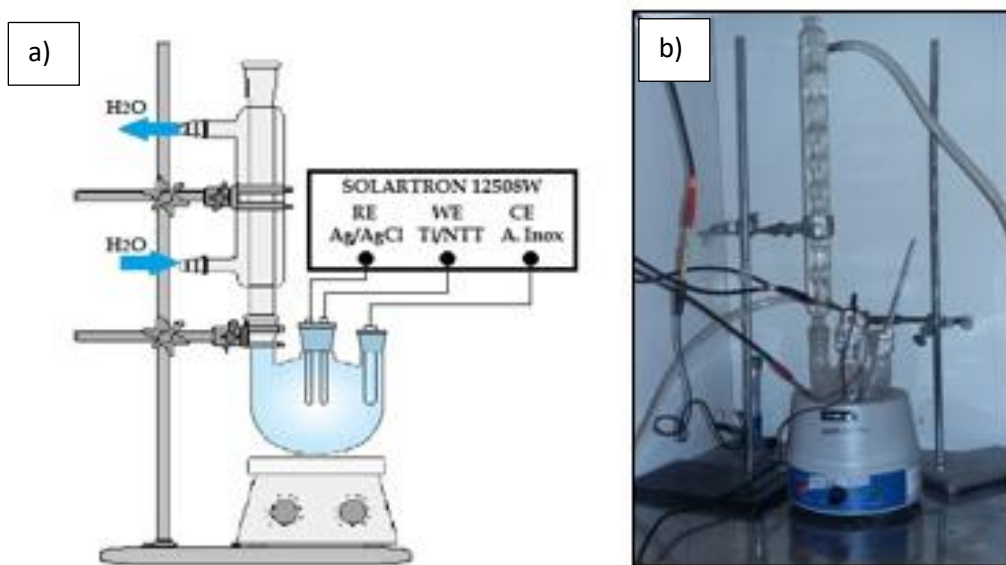


Figura 5. 3. Proceso de electrodeposición pulsada, a) Diagrama esquemático y b) Imagen de la celda electrolítica y sistema de calefacción empleados en el proceso

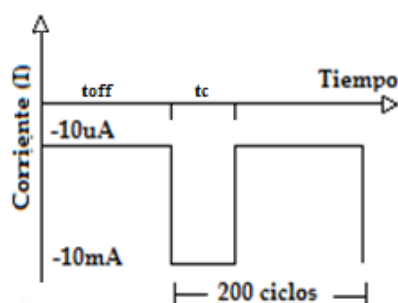


Figura 5. 4. Forma de onda esquemática de corriente aplicada durante el proceso de electrodeposición

Estudio de la forma de onda de corriente (I) para la deposición

En una primera etapa se probaron dos tipos distintos de formas de onda de corriente para realizar la deposición del cerámico sobre sustratos de Ti anodizados; a saber, corriente continua y corriente pulsada utilizando una celda tripolar. Previo al proceso de deposición, el electrodo de trabajo con NT de TiO_2 en su superficie fue sometido a un tratamiento alcalino en una solución 0,5 M de NaOH. La electrodeposición se realizó con una corriente continua de -10mA por 5 minutos y con una corriente de pulso de -10 mA por 0,2 s (tc) y una corriente de base de -1 mA por 10 s (toff) utilizando 200 ciclos. Seguidamente, el electrodo fue enjuagado con abundante agua destilada y secado en estufa a 60 °C durante 1 h. Finalmente, el electrodo fue desincluido del acrílico y almacenado en un recipiente hermético.

Estudio de la temperatura de deposición

Dos temperaturas distintas de deposición fueron estudiadas con un $n=3$, a saber 80°C y 95°C. Previo al proceso de deposición, el electrodo de trabajo con NT de TiO_2 en su superficie fue sometido a un tratamiento alcalino en una solución 0,5 M de NaOH. La electrodeposición se realizó con una corriente de pulso de -10 mA por 0,1 s (tc) y una corriente de base de -10 uA por 10 s (toff) utilizando 200 ciclos. Seguidamente, el electrodo fue enjuagado con abundante agua destilada y secado en estufa a 60 °C durante 1 h. Finalmente, el electrodo fue desincluido del acrílico y almacenado en un recipiente hermético.

Estudio del tiempo de deposición

Se estudiaron tres tiempos de deposición (tc) distintos, a saber: 0,1 s, 0,45 s y 1 s con un $n=3$. Previo al proceso de deposición, el electrodo con NT de TiO_2 en su superficie, fue sometido a un tratamiento alcalino en una solución 0,5 M de NaOH. La electrodeposición se realizó con una corriente de pulso de -10 mA durante un tiempo tc y una corriente de base de -10 uA por 10 s (toff) utilizando 200 ciclos de pulsos y a una temperatura de 95 °C. Seguidamente, el electrodo fue enjuagado con abundante agua destilada y posteriormente secado en estufa a 60 °C durante 1 h, luego el electrodo fue desincluido del acrílico y almacenado en un recipiente hermético.

Evaluación morfológica y composicional

Las muestras se observaron con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Supra 55VP, Zeiss, CIME, Tucumán) con un detector de electrones secundarios SE2 a 5 KV, WD= 4 mm y con magnificación de 250X, 2,5KX, 15KX y 50KX. El análisis de imágenes se realizó con el programa ImageJ versión 1.49v (Rasband 2016). El estudio de la composición de los recubrimientos obtenidos fue evaluado mediante EDS utilizando el microscopio de barrido de emisión de campo mencionado arriba y por medio de espectroscopia Raman utilizando un láser de 532 nm, con un nivel de potencia de 9 mW, red de difracción de 900 líneas/mm y apertura confocal seleccionada en 50 μm (DXR, Thermo scientific, LERa, CCT CONICET-UNT, Tucumán). El espectro es el resultado de 40 exposiciones, cada una de 2 s. Para este análisis, se duplicó el número de ciclos del proceso de electrodeposición para así obtener mayor cantidad de recubrimiento y poder realizar el estudio solamente del fosfato cálcico depositado y obtenido del raspado suave de una muestra. Los espectros fueron analizados con el software OMNIC For Dispersive Raman (versión 8.3.103, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Análisis estadístico

Para el estudio de la temperatura, los datos se analizaron utilizando test t. El nivel de significancia empleado fue de 0,05. Se empleó el software estadístico R versión 3.2.2 (R Core Team 2015).

Para el estudio del tiempo, los datos de longitud de las barras se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y para identificar diferencias significativas entre los tres grupos se utilizó como contraste post-hoc la prueba de Mann-Whitney con ajuste de Bonferroni. El análisis de datos estadístico se realizó con el software R versión 3.2.2 (R Core Team 2015).

5.3. Resultados y Discusión

En una primera instancia se evaluó el método más adecuado para la obtención de estructuras nanométricas con morfología similar a la HA encontrada en el hueso humano. La figura 5.5 a) y b) muestra el recubrimiento obtenido con una señal de corriente constante de -10 mA, en donde se observan depósitos de cerámico irregulares de tamaño nanométrico y forma globular y porosa. Para el caso de la deposición por corriente pulsada, en la figura 5.5 c) y d) se observa que la deposición de cerámico se efectuó más homogéneamente en toda la superficie del sustrato y el depósito resultante es una combinación de estructuras nanométricas en forma de agujas intercaladas con estructuras en forma de placa o láminas. Ambas formas de onda permitieron un recubrimiento completo del sustrato de Ti cubriendo ampliamente las estructuras nanotubulares en la superficie del Ti.

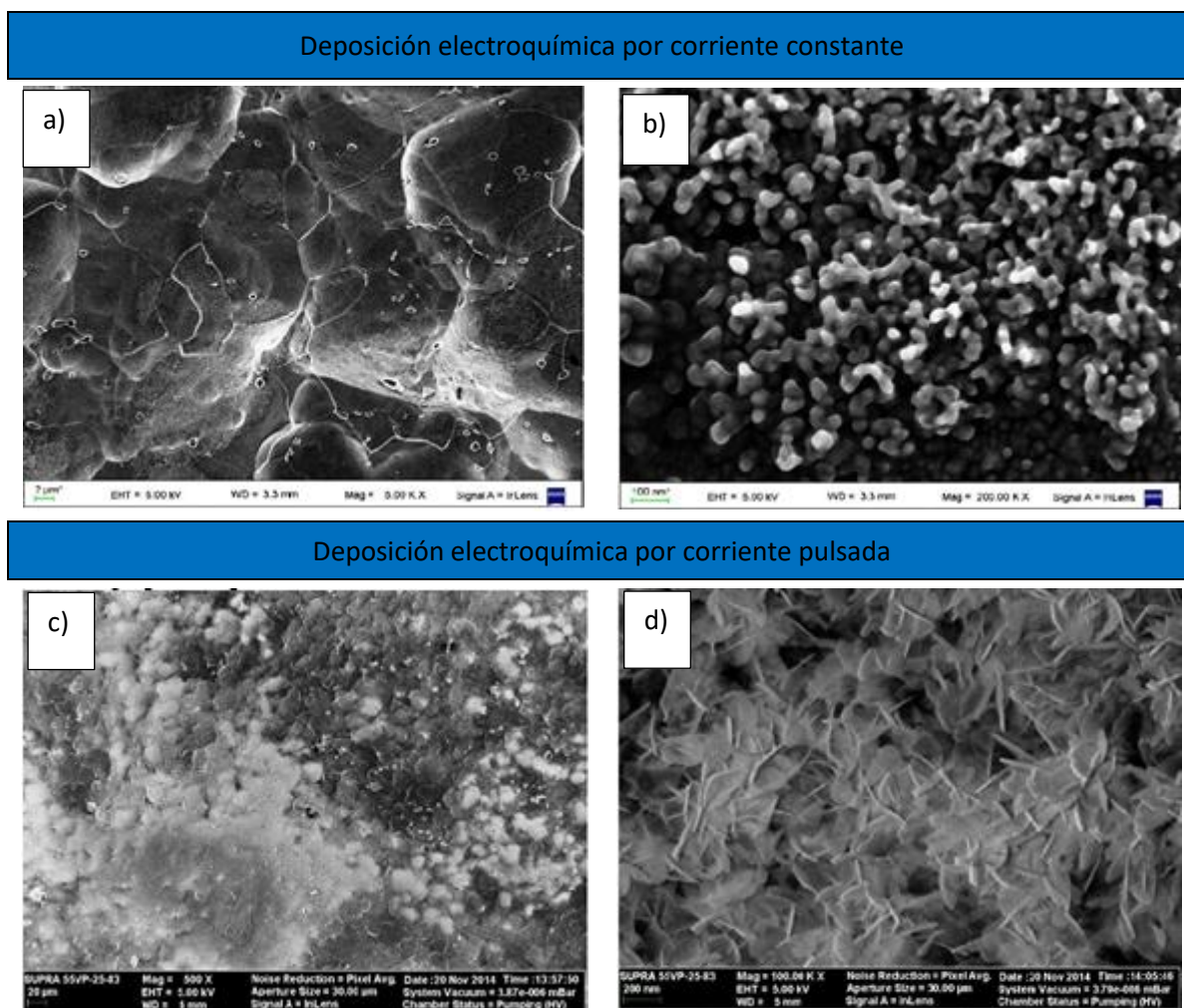


Figura 5.5. Deposición controlada por corriente usando la solución de trabajo con precursores de HA a) y b) I constante de -10 mA por 5 minutos en celda tripolar, c) y d) I pulsada de -10 mA por 0.2 s y -1 mA por 10 s por 200 ciclos

Los resultados indican que el recubrimiento realizado por corriente pulsada muestra la presencia de bastones o agujas con dimensiones nanométricas lo cual se correspondería con una mayor

similitud a la morfología de los cristales de HA del hueso humano de acuerdo con [299]. Razón por la cual se decidió profundizar en el estudio de corriente pulsada de manera de optimizar la morfología de la deposición del fosfato cálcico. Los siguientes ensayos se realizaron disminuyendo la corriente base a $-1\mu\text{A}$ de manera de controlar la deposición solamente con el pulso de corriente.

Efecto de la temperatura de deposición

Las deposiciones de fosfatos cálcicos realizadas a distintas temperaturas, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, se muestran en la figura 5.6 a-h, respectivamente a través de micrografías tomadas por un microscopio de barrido a diferentes magnificaciones. Se puede apreciar que el crecimiento, en ambos grupos, se produjo sobre los NT de TiO_2 en forma de nanobarras orientadas verticalmente y en algunas partes de las muestras, dichas nanobarras se encuentran formando nanorosetas.

Cuando la temperatura de la solución de trabajo se mantuvo a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, los depósitos obtenidos se caracterizaron por presentar una deposición amorfa y densa sobre y entre las nanobarras, además, en este grupo de muestras, se observaron mayor cantidad de áreas sin recubrimiento en comparación a las muestras fabricadas con una temperatura de deposición de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Al analizar la longitud de las nanobarras se evidenció diferencias significativas entre los dos grupos ($p \leq 0,05$), tabla 5.1. Claramente se ve que las muestras depositada a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ presentan una mayor longitud de las nanobarras, ver figura 5.7.

Otros trabajos[314], [326] obtuvieron recubrimientos similares a 80°C y 85°C , mientras que Ban [323] reportó que el tamaño de los depósitos en forma de nanobarras hexagonales de HA, formados a 90° , 110° , 130° , 150° , 170° , y $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, aumentan notablemente con el incremento de la temperatura del electrolito, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Por lo tanto, la temperatura de deposición tiene un efecto significativo en el recubrimiento de fosfatos cálcicos, y la de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ podrían resultar más apropiada para producir un cubrimiento completo del sustrato.

Tabla 5. 2. Longitud media de nanobarras de fosfatos cálcicos producidas a distintas temperaturas de deposición

Temperatura de deposición	Longitud [nm] ($\bar{x} \pm \text{DS}$)
80°C	$606,9 \pm 99,9$
95°C	$907 \pm 134,9$

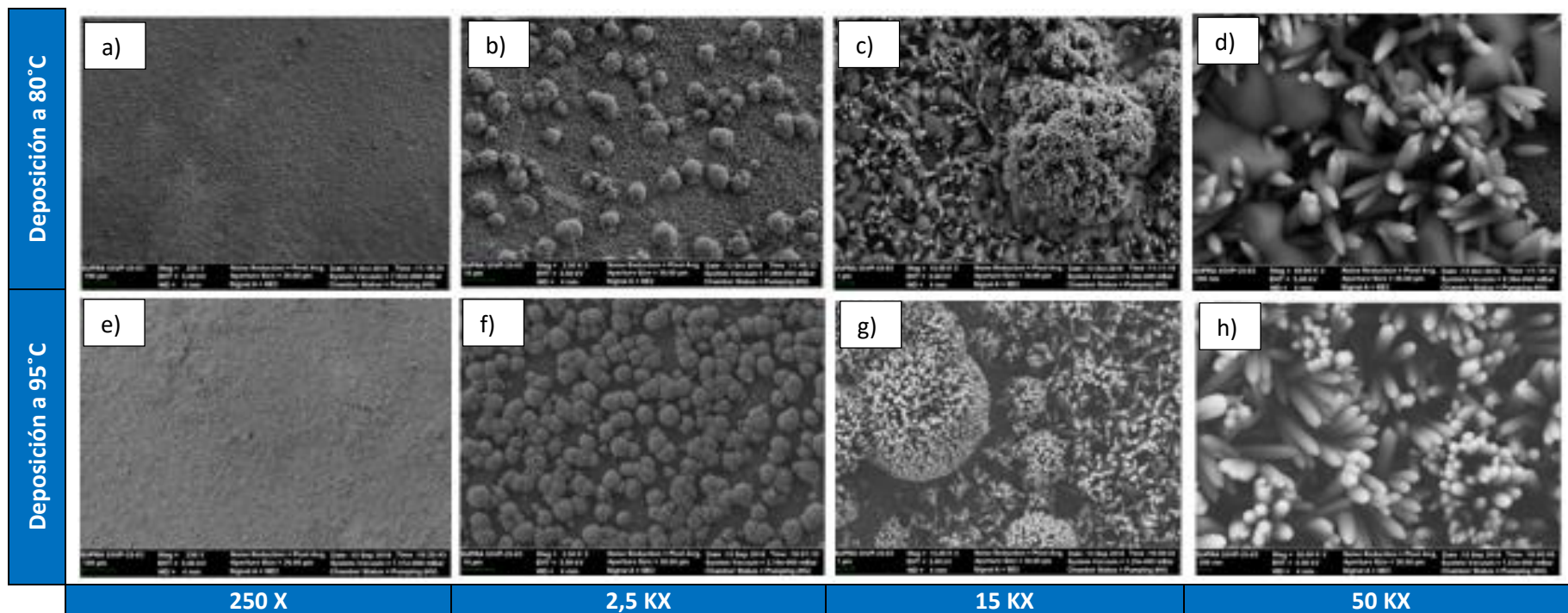


Figura 5. 6. Micrografías MEB de deposiciones realizadas a distintas temperaturas, a), b) c) y d) usando la solución de trabajo a 85°C y e), f) g) y h) usando la solución de trabajo a 95°C, todas a diferentes magnificaciones, 250 X; 2,5 KX; 15 KX; 50 KX, de izquierda a derecha

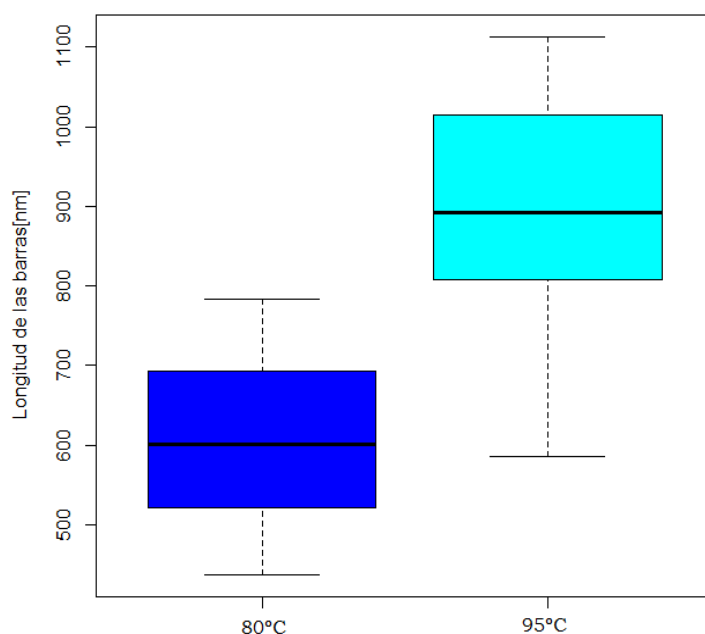


Figura 5. 7. Longitud de nanobarras de fosfatos cálcicos en función de la temperatura de deposición

Efecto del tiempo de deposición

En la figura 5.8 se muestran los resultados de las microfotografías MEB obtenidos para las deposiciones de fosfatos cálcicos sobre NT de TiO_2 realizadas a distintos tiempos de deposición, con $t_c = 0,1$ s; $t_c=0,45$ s y $t_c = 1$ s; y diferentes magnificaciones.

Para todos los tiempos de deposición, el recubrimiento obtenido también se encuentra formado por nanobarras orientadas verticalmente y por nanorosetas. Para $t_c=0,1$ s, se encontraron algunas áreas del sustrato sin depósitos, en las que se puede observar la capa nanotubular de TiO_2 , ver figura 5.8 a), b), c) y d). Para $t_c=0,45$ s, se observó la presencia de algunas áreas con una mayor cantidad de depósitos en forma de capas, figura 5.8 e), f), g) y h), mientras que para el tiempo de deposición $t_c = 1$ s, la cantidad del recubrimiento aumentó considerablemente, tapando completamente la superficie nanotubular del sustrato. Además, se observó en este último un aumento en el tamaño y cantidad de nanorosetas sobre la superficie, figura 5.8 i), j), k) y l).

Al comparar las longitudes de la nanobarras obtenidas para los distintos tiempos de deposición (tabla 5.2), los grupos muestrales obtenidos con $t_c = 0,1$ s y $t_c = 0,45$ s, mostraron diferencias estadísticas respecto al grupo con $t_c = 1$ s (figura 5.9). Sin embargo, no se evidenció diferencias significativas entre los dos primeros grupos.

Los resultados obtenidos sugieren que la cantidad y longitud de las nanobarras tienden a aumentar conforme lo hace el tiempo de deposición.

Chen [326] utilizó ciclos compuestos por $t_c = 1$ s y $t_{\text{off}} = 10$ s con 30, 90 y 180 ciclos de deposición. Reportó que la cantidad de sedimentos aumenta gradualmente con el tiempo de deposición y que, si bien los recubrimientos producidos a 180 ciclos resultan más densos, las nanobarras en la capa superficial resultan más pequeñas que las obtenidas a los 90 ciclos. Aunque obtuvieron recubrimientos en forma de nanobarras, no reportaron medidas morfológicas de las mismas.

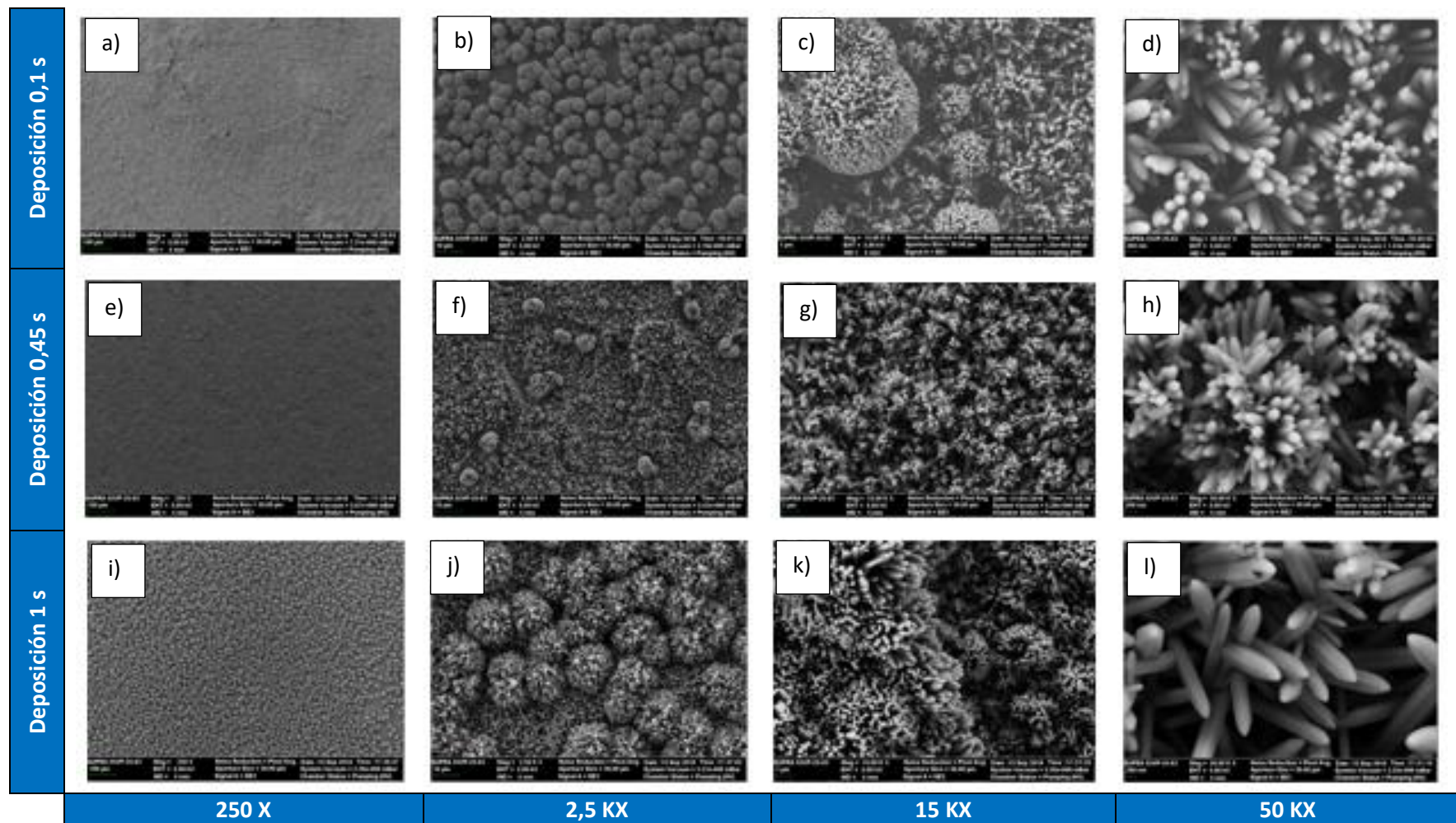


Figura 5. 8. Micrografías MEB de deposiciones realizadas a distintos tiempos de deposición, a), b) c) y d) a 0,1 segundos, e), f), g) y h) a 0,45 segundos y i), j), k) y l) a 1 segundo. De izquierda a derecha la magnificación es 250X; 2,5kX; 15kX; 50kX.

La presencia de áreas sin recubrimientos y con sedimentos en forma de pétalos en la parte superior de las nanobarras, similares a las nanorosetas obtenidas en este trabajo, también fue observado por Li [327] quien atribuyó esto al modo de transferencia de masa durante la electrodeposición. Sugirió al respecto que el uso de agitación electromagnética o ultrasónica durante el proceso promueve la formación de sedimentos uniformes sobre la superficie del sustrato.

Tabla 5. 3. Longitud media de nanobarras de fosfatos cálcicos producidas a distintos tiempos de deposición.

Tiempo de deposición t_c [s]	Longitud [nm]($\bar{x} \pm DS$)
0,1	$907 \pm 134,8$
0,45	$1065,4 \pm 304,8$
1	$2292 \pm 360,2$

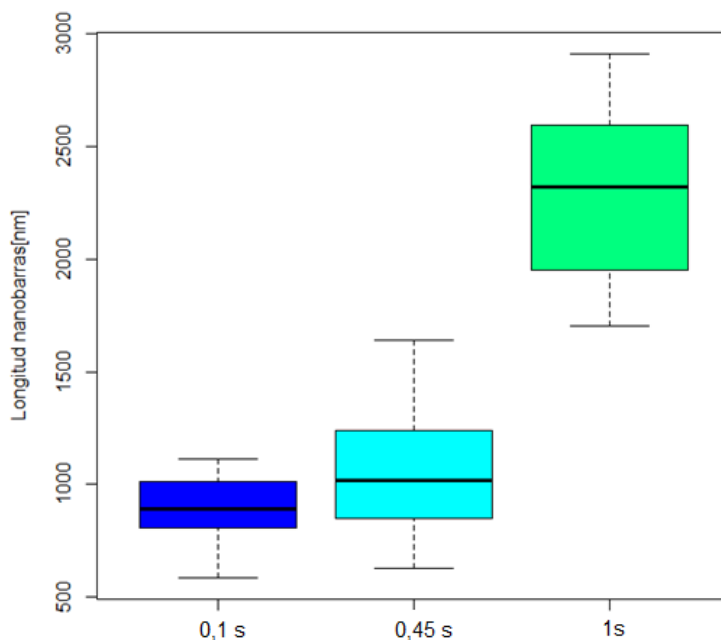


Figura 5. 9. Longitud de nanobarras de fosfatos cálcicos en función del tiempo de deposición. n=20

Por otro lado, si bien en esta tesis no se realizaron mediciones de la fuerza de adhesión del recubrimiento de fosfato cálcico al sustrato, de acuerdo a la literatura se sabe que la presencia de la capa de NT de TiO_2 mejora y aumenta de manera favorable la unión de la HA al sustrato comparando con un recubrimiento electrodepositado en un Ti con superficie lisa [307], [328]), razón por la cual se esperaría que nuestros sustratos se comporten de la misma manera.

Considerando que el depósito de calcio obtenido en nuestros sustratos es de origen sintético se realizó un estudio composicional en una de las muestras a modo demostrativo para identificar la naturaleza y composición química del mismo. La electrodeposición en la muestra analizada se realizó con una corriente de pulso de -10 mA durante un tiempo $t_c = 0,45$ s y una corriente de base de -10 μA por 10 s (toff) utilizando 200 ciclos de pulsos y a una temperatura de 95 °C.

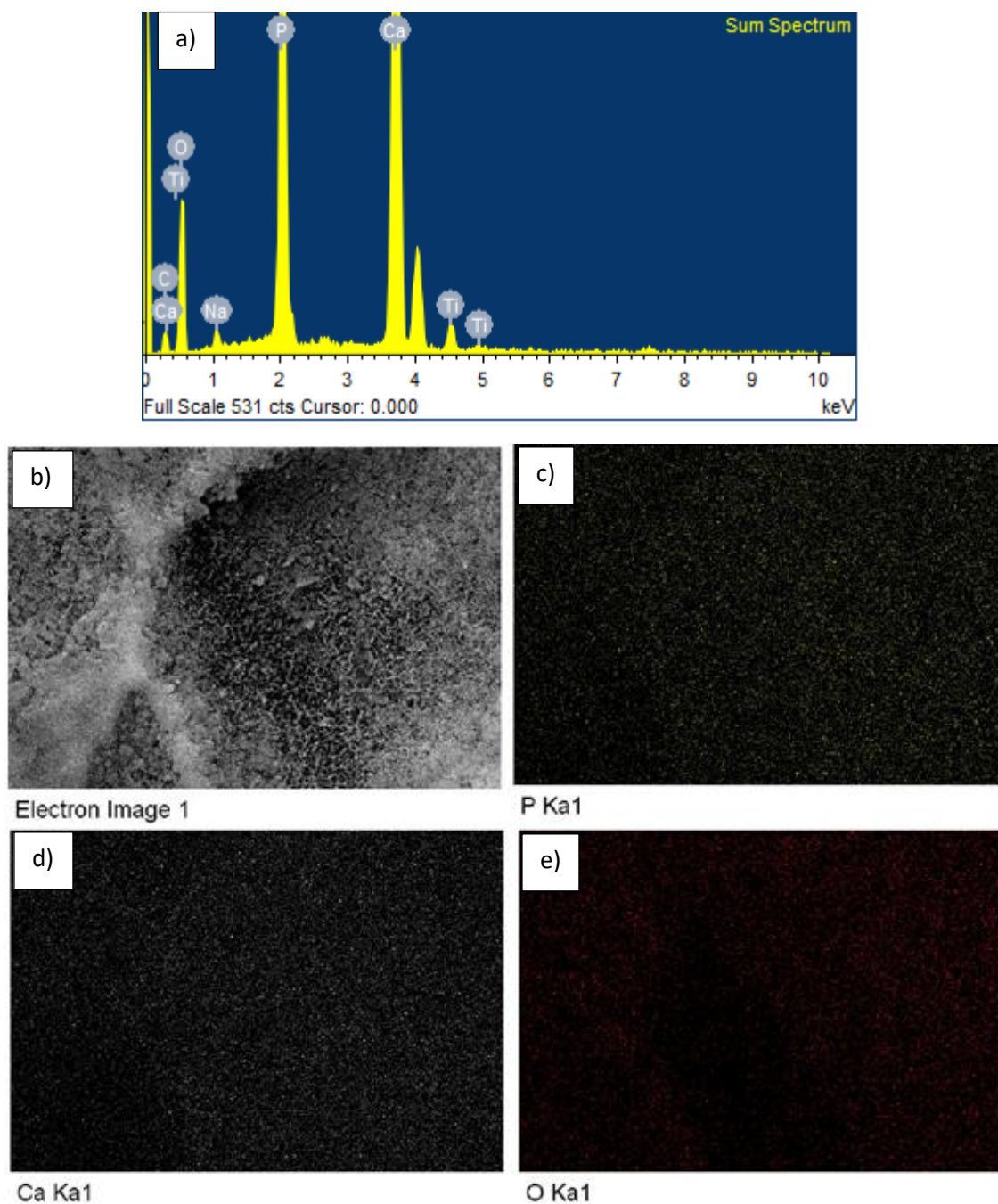


Figura 5. 10. Estudio composicional de una muestra depositada por corriente pulsada de -10 mA durante un tiempo de 0,45 s (tc) y -10 μ A de I de base por 10 s (toff), a) EDS del recubrimiento depositado sobre una muestra de Ti anodizada, b) área de estudio de la muestra y distribución punto a punto de los elementos c) fósforo, d) calcio y e) oxígeno del recubrimiento electrodepositado

La figura 5.10 a) y b) muestran los resultados del EDS en forma espectro y de mapeo de nuestro recubrimiento. Esto permite confirmar la presencia de los elementos Ca y P distribuidos homogéneamente en toda la superficie. A su vez se evidenciaron restos de Na provenientes del tratamiento alcalino al cual es sometida la muestra previo al proceso de deposición. Vale recalcar

que la solución de deposición fue diseñada con las concentraciones adecuadas de cada químico precursor para obtener como recubrimiento HA con una relación de Ca/P=1,67, la cual corresponde con la relación Ca/P de la HA humana. Dado que la técnica anterior sólo señala los elementos atómicos presentes en la muestra, para confirmar la presencia de hidroxiapatita se recurrió a espectroscopía Raman para registro de las especies moleculares presentes. Como se puede observar claramente en el siguiente espectro de la figura 5.11, las bandas a 430 cm^{-1} , 590 cm^{-1} , 962 cm^{-1} y 1074 cm^{-1} corresponden a los picos característicos de la HA. Todos los picos indican el estiramiento de diferentes enlaces en PO_4^{3-} iones. La banda más intensa en 962 cm^{-1} corresponde al modo de estiramiento simétrico ν_1 P—O del tetraedro PO_4^{3-} [329]. Este pico confirma la presencia de HA en nuestro recubrimiento ya que es único y diferente a todos los picos de otros materiales de fosfato de calcio [330].

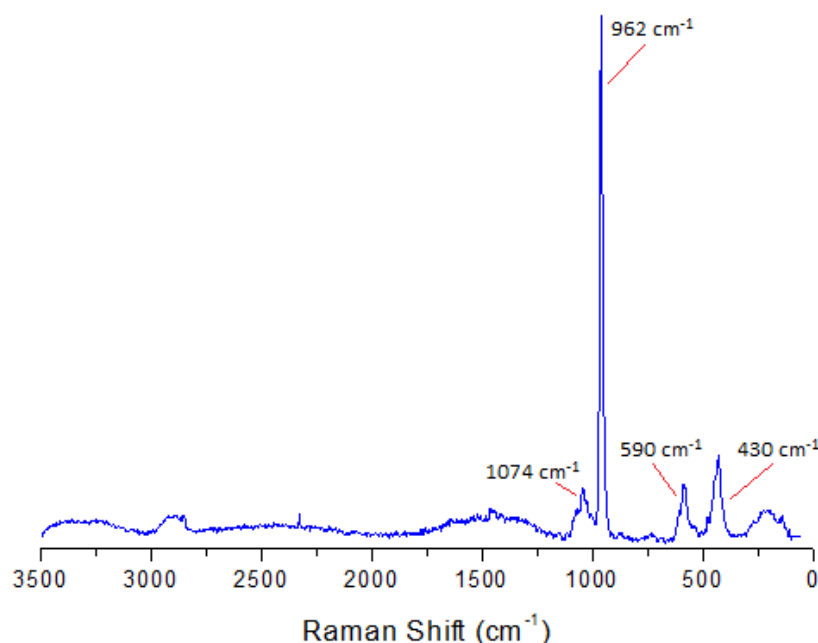


Figura 5. 11. Espectro Raman del recubrimiento obtenido. La fuerte banda a 962 cm^{-1} corresponde a un modo vibracional entre P-O del tetraedro PO_4^{3-} .

5.4. Conclusión

Se logró realizar deposiciones HA sintética con nanoestructuras similares en forma al tejido oseo natural sobre sustratos de Ti médico previamente anodizados y modificados superficialmente con nanotubos de TiO_2 . Los recubrimientos fueron obtenidos en tiempos relativamente cortos y a bajas temperaturas (menores a 100°C) por lo que la microarquitectura y composición del titanio subyacente no fueron alterados. En todos los casos los recubrimientos obtenidos presentaron dimensiones nanométricas y formas de nanobarras y nanorrosetas cuando la corriente utilizada era de tipo pulsada. De las dos temperaturas evaluadas, 80°C y 95°C , la superior produjo una mayor área cubierta de fosfatos cálcicos sobre el sustrato. De los tres tiempos empleados, 0,1; 0,45 y 1 segundos, el mayor produjo un recubrimiento completo del sustrato. Además, se observó que la longitud de las nanobarras aumenta tanto con el incremento de la temperatura como con el aumento del tiempo de deposición.

6. Análisis General

6.1. Conclusión

La ingeniería de superficies es una de las herramientas más importantes para mejorar la biocompatibilidad y conferir propiedades bioactivas en los implantes médicos metálicos. Dichos implantes todavía consisten en la mejor opción para desempeñarse en situaciones de carga debido a sus excelentes propiedades mecánicas. Sin embargo, la falla del implante óseo ocurre principalmente debido a una pobre oseointegración o a una periimplantitis relacionada a la colonización de bacterias en su superficie. Recientemente, los investigadores se han centrado en mejorar la biocompatibilidad de las superficies para disminuir los tiempos de osteointegración que en definitiva están relacionados con un menor tiempo de carga del implante, mejor desempeño del dispositivo y disminución de costos asociados, sin mencionar el beneficio del paciente. A la vez, diferentes modificaciones superficiales han sido propuestas y alguna de ellas son actualmente utilizadas en implantes comerciales, sin embargo, la mayoría de las modificaciones utilizadas comercialmente son en escala micrométrica. No obstante, la incorporación de una rugosidad nanométrica podría mostrar mayores ventajas a nivel de la respuesta celular.

En este trabajo se ha desarrollado y optimizado la obtención de superficies de Ti modificadas en dos niveles, micrométrico mediante fabricación de microcanales y nanométrico mediante la fabricación de estructuras tubulares en la capa de óxido de titanio. Se utilizó la línea celular de osteoblastos fetales humanos, ya que, de acuerdo con la bibliografía existen muy pocas investigaciones acerca de la respuesta de osteoblastos en implantes, siendo el comportamiento de células mesenquimáticas o preosteoblasticas lo más estudiado. Nuestros resultados demostraron una proliferación celular favorecida por un efecto sinérgico de la presencia de microcanales y nanotubos en los sustratos; donde los primeros aumentan la superficie efectiva de la muestra exponiendo una mayor cantidad de puntos de contacto, mientras que los segundos permiten una mayor adhesión y agarre mecánico de los osteoblastos ya que la apertura de los NT funciona como puntos de anclaje de los filopodios celulares. A su vez, la presencia de estas rugosidades induce una mayor formación de filopodios por parte de los osteoblastos lo que incrementa las posibilidades de agarre de la célula al sustrato. Este comportamiento de las prolongaciones celulares con la nanorugosidad no fue reportado anteriormente y está relacionado directamente a la geometría superficial de los nanotubos. Se observó también, que la geometría tubular lograda abre múltiples posibilidades para incorporar, en un futuro diferentes agentes bioactivos que podrían ser liberados en función del tiempo o realizar deposiciones superficiales que podrían conferirle nuevas propiedades al sustrato como por ejemplo las demostradas en esta tesis: capacidad antibacteriana mediante deposición de NP de Ag y nanoestructuración de hidroxiapatita que induciría mayor bioactividad en el implante. Por lo tanto, las dimensiones micro y nanométrica actúan sinérgicamente lo que resultaría en una proliferación osteoblástica aumentada con mayor fijación inicial al implante. Esta traba biomecánica y el acelerado crecimiento de la densidad celular permitiría disminuir los tiempos de osteointegración y mejorar extensamente la calidad de vida del paciente, disminuyendo la probabilidad de fallas y evitando la necesidad de nuevos procedimientos quirúrgicos.

6.2. Proyecciones

Teniendo en cuenta los resultados de nuestra investigación es necesario continuar con una exhaustiva caracterización físico, química y biológica de la superficie a efectos de poder implementar la modificación superficial propuesta en el mercado de implantes de titanio.

Para ello se debe:

- Analizar la adherencia de la capa nanotubular al titanio acorde a normas ISO
- Estudiar los niveles de toxicidad producidos por un posible desprendimiento de la capa o por disolución de ella
- Estudiar la respuesta *in vivo* de nuestros sistemas en laboratorios certificados en un modelo animal apropiado acorde a normativas ISO
- Diseñar un sistema escalado para la fabricación de implantes con superficie anodizada que permita trabajar simultáneamente con varios sustratos en paralelo para optimizar su producción.

Referencias

- [1] D. Mihov and B. Katerska, "Some Biocompatible Materials Used in Medical Practice.," *Trakia J. Sci.*, vol. 8, pp. 119–125, 2010.
- [2] D. F. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 29, no. 20, pp. 2941–2953, 2008.
- [3] D. F. Williams, *Titanium for medical applications*. Springer, 2001.
- [4] C. Ning, L. Zhou, and G. Tan, "Fourth-generation biomedical materials," *Mater. Today*, vol. 19, no. 1, pp. 2–3, 2016.
- [5] N. Sachot *et al.*, "Towards 4th generation biomaterials: a covalent hybrid polymer–ormoglass architecture," *Nanoscale*, vol. 7, no. 37, pp. 15349–15361, 2015.
- [6] I. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, M. A. Alobera-Gracia, M. Del-Canto-Pingarrón, and L. Blanco-Jerez, "Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue.," *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, vol. 11, no. 1, pp. 47–51, 2006.
- [7] X. Wang *et al.*, "Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review," *Biomaterials*, vol. 83, pp. 127–141, 2016.
- [8] C. Sfeir, L. Ho, B. A. Doll, K. Azari, and J. O. Hollinger, "Fracture repair," in *Bone Regeneration and repair: Biology and clinical applications*, J. R. Lieberman and G. E. Friedlander, Eds. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2005, pp. 21–44.
- [9] J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone," *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 2, pp. 92–102, 1998.
- [10] K. Choi, J. L. Kuhn, M. J. Ciarelli, and S. A. Goldstein, "The elastic moduli of human subchondral, trabecular, and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus," *J. Biomech.*, vol. 23, no. 11, pp. 1103–1113, 1990.
- [11] J. Henkel *et al.*, "Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective," *Bone Res.*, vol. 1, no. 3, pp. 216–248, 2013.
- [12] M. J. Olszta *et al.*, "Bone structure and formation: A new perspective," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 58, no. 3–5, pp. 77–116, 2007.
- [13] F. Schwarz, M. Herten, M. Sager, M. Wieland, M. Dard, and J. Becker, "Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA® titanium implants: Preliminary results of a pilot study in dogs," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 18, no. 4, pp. 481–488, 2007.
- [14] J. A. Guerrero, J. C. Vanegas, D. A. Garzón, M. Casale, and H. Arzate, "Mechanobiology of Oral Implantable Devices," in *Biomaterials Science and Engineering*, R. Pignatello, Ed. InTech, 2011, pp. 309–336.
- [15] P.-I. Brånemark, U. Breine, R. Adell, B. O. Hansson, J. Lindström, and Å. Ohlsson, "Intra-Osseous Anchorage of Dental Prostheses: I. Experimental Studies," *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 3, no. 2, pp. 81–100, 1969.

- [16] T. Albrektsson and M. Jacobsson, "Bone-metal interface in osseointegration," *J. Prosthetic Dentistry*, vol. 57, no. 5, pp. 597–607, 1987.
- [17] J. Davies, "Understanding peri-implant endosseous healing," *J. Dent. Educ.*, vol. 67, no. 8, pp. 932–949, 2003.
- [18] T. Albrektsson and C. Johansson, "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration," *Eur. Spine J.*, vol. 10, pp. S96–S101, 2001.
- [19] R. Smeets *et al.*, "Review Article Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration," vol. 2016, 2016.
- [20] U. Joos, H. P. Wiesmann, T. Szuwart, and U. Meyer, "Mineralization at the interface of implants," *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 35, no. 9, pp. 783–790, 2006.
- [21] M. A. Listgarten, D. Buser, S. G. Steinemann, K. Donath, N. P. Lang, and H. P. Weber, "Light and Transmission Electron Microscopy of the Intact Interfaces Between Non-submerged Titanium-coated Epoxy Resin Implants and Bone or Gingiva," *J. Dent. Res.*, vol. 71, no. 2, pp. 364–371, 1992.
- [22] T. Albrektsson, P.-I. Brånemark, H.-A. Hansson, and J. Lindström, "Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man," *Acta Orthop. Scand.*, vol. 52, no. 2, pp. 155–170, 1981.
- [23] M. Geetha, A. K. Singh, R. Asokamani, and A. K. Gogia, "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 54, no. 3, pp. 397–425, 2009.
- [24] A. W. Tan, B. Pingguan-Murphy, R. Ahmad, and S. A. Akbar, "Review of titania nanotubes: Fabrication and cellular response," *Ceram. Int.*, vol. 38, no. 6, pp. 4421–4435, 2012.
- [25] D. Rodríguez Rius, "El titanio y sus propiedades," *Impladent*, Illinois, pp. 11–15, Mar-2002.
- [26] S. Martínez-Villalobos Castillo, "Controversias en Cirugía Oral y Maxilofacial : Parte I Osteosíntesis maxilofacial con titanio Maxillofacial osteosynthesis with titanium," *Rev. Española Cirug Oral y Maxilofac.*, vol. 26, pp. 351–368, 2004.
- [27] M. Niinomi, "Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 1, no. 1, pp. 30–42, 2008.
- [28] D. F. Williams and R. L. Williams, *Degradation effects of the biological environment on metal and ceramics*. 1996.
- [29] J. M. HERNÁNDEZ LÓPEZ, "Funcionalización superficial de aleaciones de titanio mediante anodizado para aplicaciones biomédicas," 2015.
- [30] D. V. Shtansky *et al.*, "Design, characterization and testing of Ti-based multicomponent coatings for load-bearing medical applications," *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 2909–2924, 2005.
- [31] S. E. Rodil, "Modificación Superficial De Biomateriales Metálicos," *Rev. Latinoam. Metal. y Mater.*, vol. 29, no. 2, pp. 67–83, 2009.
- [32] E. F. Leonard and L. Vroman, "Is the Vroman effect of importance in the interaction of

- blood with artificial materials?," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 3, no. 1, pp. 95–107, 1991.
- [33] J. Park, S. Bauer, K. A. Schlegel, F. W. Neukam, K. von der Mark, and P. Schmuki, "TiO₂ Nanotube Surfaces: 15 nm-An Optimal Length Scale of Surface Topography for Cell Adhesion and Differentiation," *Small*, vol. 5, no. 6, pp. 666–671, Mar. 2009.
 - [34] S. Szmukler-Moncler, H. Salama, Y. Reingewirtz, and J. H. Dubruille, "Time of loading and effect of micromotion on bone – dental implant interface : Review of experimental literature," *J Biomed Mater Res*, vol. 43, no. 2, pp. 192–203, 1998.
 - [35] C. Weiss and A. Weiss, *Principles and practice of implant dentistry*. Mosby, 2001.
 - [36] G. Greenstein and J. Cavallaro, "Failed dental implants: diagnosis, removal and survival of reimplantations," *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 145, no. 8, pp. 835–42, 2014.
 - [37] A. Schroeder, F. Sutter, and G. Krekeler, *Implantología oral*. 1993.
 - [38] S. Geissler, "Surface functionalization of dental implants for improved biological response and reduced infection risk," University of Oslo, 2017.
 - [39] D. P. Tarnow, S. Emtiaz, and A. Classi, "Immediate Loading of Threaded Implants at Stage 1 Surgery in Edentulous Arches: Ten Consecutive Case Reports With 1- to 5-Year Data," *The Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 12, no. 3, pp. 1–12, 1997.
 - [40] K. Randow, K. Nilner, A. Petersson, and P. Glantz, "Immediate functional loading of Brånemark dental implants. An 18-month clinical follow-up study," *Clin Oral Implant. Res*, vol. 10, no. 1, pp. 8–15, 1999.
 - [41] P. Branemark, P. Engstrand, L. Ohmell, and K. Grondahl, "Branemark Novum: A New Treatment Concept for Rehabilitation of the Edentulous Mandible . Preliminary Results from a Prospective Clinical Follow-up Study," *Clin. Implant Dent. Relat. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 2–16, 1999.
 - [42] H. K. Uthoff, "Mechanical Factors Influencing the Holding Power of Screws in Compact Bone," *J. Bone Jt. Surg.*, vol. 55B, no. 3, pp. 633–639, 1973.
 - [43] D. M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, and P. Thomsen, *Titanium in Medicine Science, Surface Science, Engineering, Biological Response an Medical Applications*. Germany: Springer, 2001.
 - [44] L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, and Y. Amouriq, "Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration," *Dent. Mater.*, vol. 23, no. 7, pp. 844–854, Jul. 2007.
 - [45] A. Bagno and C. Di Bello, "Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 15, no. 9, pp. 935–949, 2004.
 - [46] C. Han, C. B. Johansson, A. Wennerberg, and T. Albrektsson, "Quantitative and qualitative investigations of surface enlarged titanium and titanium alloy implants," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 9, pp. 1–10, 1998.
 - [47] M. Pegueroles *et al.*, "Spatial organization of osteoblast fibronectin matrix on titanium surfaces: Effects of roughness, chemical heterogeneity and surface energy," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 1, pp. 291–301, 2010.

- [48] J. Y. Martin *et al.*, "Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 29, no. 3, pp. 389–401, 1995.
- [49] V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, and A. Zweck, "The emerging nanomedicine landscape," *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 10, pp. 1211–1217, 2006.
- [50] A. F. Cipriano, N. De Howitt, S. C. Gott, C. Miller, M. P. Rao, and H. Liu, "Bone marrow stromal cell adhesion and morphology on micro- and sub-micropatterned titanium," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 4, pp. 660–668, 2014.
- [51] H. G. Craighead, C. D. James, and A. M. P. Turner, "Chemical and topographical patterning for directed cell attachment," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 5, no. 2–3, pp. 177–184, 2001.
- [52] E. Gongadze *et al.*, "Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 1801–1816, 2011.
- [53] K.-H. Kim and N. Ramaswamy, "Electrochemical surface modification of titanium in dentistry," *Dent. Mater. J.*, vol. 28, no. 1, pp. 20–36, 2009.
- [54] J. C. Balza *et al.*, "Sandblasting as a surface modification technique on titanium alloys for biomedical applications: abrasive particle behavior," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 45, p. 12004, 2013.
- [55] a Nanci *et al.*, "Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 324–35, 1998.
- [56] K.-H. Kim, R. Narayanan, and T. Rautray, *Surface modification of titanium for biomaterial applications*. 2013.
- [57] P. Li, I. Kangasniemi, K. de Groot, and T. Kokubo, "Bonelike Hydroxyapatite Induction by a Gel-Derived Titania on a Titanium Substrate," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 77, no. 5, pp. 1307–1312, 1994.
- [58] C. J. Brinker and G. W. Scherer, "CHAPTER 1 - Introduction BT - Sol-Gel Science," San Diego: Academic Press, 1990, p. xvi-18.
- [59] P. Li *et al.*, "Apatite Formation Induced by Silica Gel in a Simulated Body Fluid," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 75, no. 8, pp. 2094–2097, 1992.
- [60] K. Yoshida, K. Kamada, K. Sato, R. Hatada, K. Baba, and M. Atsuta, "Thin sol-gel-derived silica coatings on dental pure titanium casting," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 48, no. 6, pp. 778–785, 1999.
- [61] Y. T. Sul, C. B. Johansson, Y. Jeong, and T. Albrektsson, "The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes," *Med. Eng. Phys.*, vol. 23, no. 5, pp. 329–346, 2001.
- [62] H. Schliephake, D. Scharnweber, M. Dard, A. Sewing, A. Aref, and S. Roessler, "Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 73, no. 1, pp. 88–96, 2005.
- [63] M. Morra, "Biochemical modification of titanium surfaces: Peptides and ECM proteins,"

Eur. Cells Mater., vol. 12, pp. 1–15, 2006.

- [64] S. Mistry, D. Kundu, S. Datta, and D. Basu, "Comparison of bioactive glass coated and hydroxyapatite coated titanium dental implants in the human jaw bone," *Aust. Dent. J.*, vol. 56, no. 1, pp. 68–75, 2011.
- [65] R. Family, M. Solati-Hashjin, S. N. Nik, and A. Nemati, "Surface modification for titanium implants by hydroxyapatite nanocomposite," *Casp. J. Intern. Med.*, vol. 3, no. 3, pp. 460–465, 2012.
- [66] M. Gardon and J. M. Guilemany, "Milestones in functional titanium dioxide thermal spray coatings: A review," *J. Therm. Spray Technol.*, vol. 23, no. 4, pp. 577–595, 2014.
- [67] P. LeClair, G. . Berera, and J. . Moodera, "Titanium nitride thin films obtained by a modified physical vapor deposition process," *Thin Solid Films*, vol. 376, no. 1–2, pp. 9–15, 2000.
- [68] Y. . Chen, G. . Yu, and J. . Huang, "Role of process parameters in the texture evolution of TiN films deposited by hollow cathode discharge ion plating," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 141, no. 2–3, pp. 156–163, 2001.
- [69] M. J. Jung, K. H. Nam, L. R. Shaginyan, and J. G. Han, "Deposition of Ti thin film using the magnetron sputtering method," *Thin Solid Films*, vol. 435, pp. 145–149, 2003.
- [70] T. R. Rautray, R. Narayanan, T.-Y. Kwon, and K.-H. Kim, "Surface modification of titanium and titanium alloys by ion implantation," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 93B, no. 2, pp. 581–591, 2010.
- [71] Y. Shibata and T. Miyasaki, "Anode Glow Discharges Plasma Treatment Enhances Calcium Phosphate Adsorption onto Titanium Plates," *J. Dent. Res.*, vol. 81, no. 12, pp. 841–844, 2002.
- [72] R. Junker, A. Dimakis, M. Thoneick, and J. A. Jansen, "Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 20, no. s4, pp. 185–206, Sep. 2009.
- [73] T. Albrektsson and A. Wennerberg, "Oral implant surfaces: Part 1-review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them.," *Int. J. Prosthodont.*, vol. 17, no. 5, pp. 536–43, 2004.
- [74] A. Wennerberg and T. Albrektsson, "Current challenges in successful rehabilitation with oral implants," *J. Oral Rehabil.*, vol. 38, no. 4, pp. 286–294, 2011.
- [75] A. Wennerberg and T. Albrektsson, "On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions.," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 25, no. 1, pp. 63–74, 2009.
- [76] T. Tian, X. F. Xiao, R. F. Liu, H. De She, and X. F. Hu, "Study on titania nanotube arrays prepared by titanium anodization in NH₄F/H₂SO₄ solution," *J. Mater. Sci.*, vol. 42, no. 14, pp. 5539–5543, 2007.
- [77] X. Liu, P. K. Chu, and C. Ding, "Surface nano-functionalization of biomaterials," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 70, no. 3, pp. 275–302, 2010.
- [78] M. Bamedi, M. Ayoub, R. Ladiz, and S. R. Fakour, "A Review of Modified Titanium Nanoparticle Applications in Dental Implantation," *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, vol. 4, no.

July 2015, pp. 170–174, 2015.

- [79] R. A. Gittens *et al.*, “The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 13, pp. 3395–3403, 2011.
- [80] J. Vanegas, N. Landinez, and D. Alvarado, “Generalidades de la interfase hueso-implante dental Basic principles of bone-dental implant interphase,” *Rev. Cuba. Investig. Biomédicas*, vol. 28, no. 3, pp. 130–146, 2009.
- [81] L. M. Svanborg, M. Andersson, and A. Wennerberg, “Surface characterization of commercial oral implants on the nanometer level,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 92, no. 2, pp. 462–469, 2010.
- [82] P. Gubbi and R. Towse, “Quantitative and qualitative characterization of various dental implant surfaces,” 2012.
- [83] “Catalogo ML Implant System,” 2015. [Online]. Available: <http://www.mlimplantsystem.com.ar/catalogo.php>.
- [84] E. Anitua, R. Prado, G. Orive, and R. Tejero, “Effects of calcium-modified titanium implant surfaces on platelet activation, clot formation, and osseointegration,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 3, pp. 969–980, 2015.
- [85] A. Wennerberg and T. Albrektsson, “Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 20, no. SUPPL. 4, pp. 172–184, 2009.
- [86] M. J. Frank, “Bioactive coating for titanium based bone anchored implants,” University of Oslo Norway, 2013.
- [87] L. J. A. Heitz-Mayfield, “Peri-implant diseases: Diagnosis and risk indicators,” *J. Clin. Periodontol.*, vol. 35, no. SUPPL. 8, pp. 292–304, 2008.
- [88] J. P. Albouy, I. Abrahamsson, L. G. Persson, and T. Berglundh, “Spontaneous progression of peri-implantitis at different types of implants. An experimental study in dogs. I: Clinical and radiographic observations,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 19, no. 10, pp. 997–1002, 2008.
- [89] C. Palma-Carrió, L. Maestre-Ferrín, D. Peñarrocha-Oltra, M. A. Peñarrocha-Diago, and M. Peñarrocha-Diago, “Risk factors associated with early failure of dental implants. A literature review,” *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, vol. 16, no. 4, pp. 2–5, 2011.
- [90] F. Javed and G. E. Romanos, “The role of primary stability for successful immediate loading of dental implants. A literature review,” *J. Dent.*, vol. 38, no. 8, pp. 612–620, 2010.
- [91] J. Davies, *Mechanisms of Endosseous Integration*, vol. 11. 1998.
- [92] A. Wennerberg, “The importance of surface roughness for implant incorporation,” *Int. J. Mach. Tools Manuf.*, vol. 38, no. 5–6, pp. 657–662, 1998.
- [93] H. Tsuchiya, J. M. MacAk, A. Ghicov, L. Taveira, and P. Schmuki, “Self-organized porous TiO₂ and ZrO₂ produced by anodization,” *Corros. Sci.*, vol. 47, no. 12, pp. 3324–3335, 2005.
- [94] Y. C. Lim, Z. Zainal, W. T. Tan, and M. Z. Hussein, “Anodization parameters influencing the

growth of titania nanotubes and their photoelectrochemical response," *Int. J. Photoenergy*, vol. 2012, 2012.

- [95] M. Norani Muti, a a Dzilal, and J. O. Dennis, "Effects of Synthesis Parameters on the Structure of Titania Nanotubes," *J. Eng. Sci. Technol. J. Eng. Sci. Technol. AUGUST*, vol. 3, no. 32, pp. 163–171, 2008.
- [96] G. K. Mor, O. K. Varghese, M. Paulose, K. Shankar, and C. A. Grimes, "A review on highly ordered, vertically oriented TiO₂ nanotube arrays: Fabrication, material properties, and solar energy applications," *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 90, no. 14, pp. 2011–2075, 2006.
- [97] N. K. Allam and C. A. Grimes, "Effect of cathode material on the morphology and photoelectrochemical properties of vertically oriented TiO₂ nanotube arrays," *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 92, no. 11, pp. 1468–1475, 2008.
- [98] B. C. Ward and T. J. Webster, "Increased functions of osteoblasts on nanophase metals," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, no. 3, pp. 575–578, Apr. 2007.
- [99] K. Von Der Mark, J. Park, S. Bauer, and P. Schmuki, "Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: Cues from the extracellular matrix," *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 131–153, 2010.
- [100] A. Tian *et al.*, "Nanoscale TiO₂ nanotubes govern the biological behavior of human glioma and osteosarcoma cells," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 2423–2439, 2015.
- [101] S. Bauer, J. Park, J. Faltenbacher, S. Berger, K. von der Mark, and P. Schmuki, "Size selective behavior of mesenchymal stem cells on ZrO₂ and TiO₂ nanotube arrays.," *Integr. Biol. (Camb.)*, vol. 1, no. 8–9, pp. 525–532, 2009.
- [102] G. A. Crawford, N. Chawla, K. Das, S. Bose, and A. Bandyopadhyay, "Microstructure and deformation behavior of biocompatible TiO₂ nanotubes on titanium substrate.," *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 3, pp. 359–67, May 2007.
- [103] G. A. Crawford and N. Chawla, "Porous hierarchical TiO₂ nanostructures: Processing and microstructure relationships," *Acta Mater.*, vol. 57, no. 3, pp. 854–867, Feb. 2009.
- [104] G. A. Crawford, N. Chawla, and J. E. Houston, "Nanomechanics of biocompatible TiO₂ nanotubes by Interfacial Force Microscopy (IFM).," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 2, no. 6, pp. 580–7, Dec. 2009.
- [105] H. Tsuchiya, J. M. Macak, L. Mu, J. Kunze, F. Mu, and P. Greil, "Hydroxyapatite growth on anodic TiO₂ nanotubes," pp. 23–25, 2006.
- [106] S. Grigorescu *et al.*, "The two step nanotube formation on TiZr as scaffolds for cell growth," *Bioelectrochemistry*, vol. 98, pp. 39–45, 2014.
- [107] G. Zhao *et al.*, "High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 74, no. 1, pp. 49–58, 2005.
- [108] E. Alpaslan, B. Ercan, and T. J. Webster, "Anodized 20 nm diameter nanotubular titanium for improved bladder stent applications.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, no. January 2011, pp. 219–225, 2011.

- [109] S. C. Roy, M. Paulose, and C. A. Grimes, "The effect of TiO₂ nanotubes in the enhancement of blood clotting for the control of hemorrhage," *Biomaterials*, vol. 28, no. 31, pp. 4667–4672, 2007.
- [110] C. Chon Chen, C. H. Cheng, and C. K. Lin, "Template assisted fabrication of TiO₂ and WO₃ nanotubes," *Ceram. Int.*, vol. 39, no. 6, pp. 6631–6636, 2013.
- [111] D. V. Bavykin, J. M. Friedrich, and F. C. Walsh, "Protonated titanates and TiO₂ nanostructured materials: Synthesis, properties, and applications," *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 21, pp. 2807–2824, 2006.
- [112] A. H. Mayabadi *et al.*, "Evolution of structural and optical properties of rutile TiO₂ thin films synthesized at room temperature by chemical bath deposition method," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 75, no. 2, pp. 182–187, 2014.
- [113] P. Roy, S. Berger, and P. Schmuki, "TiO₂ nanotubes: Synthesis and applications," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 13, pp. 2904–2939, 2011.
- [114] Ming Zhang, Y. Bando, and K. Wada, "Sol-gel template preparation of TiO₂ nanotubes and nanorods," *J. Mater. Sci. Lett.*, vol. 20, no. 2, pp. 167–170, 2001.
- [115] Z. R. Tian, J. A. Voigt, J. Liu, B. McKenzie, and H. Xu, "Large oriented arrays and continuous films of TiO₂-based nanotubes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 41, pp. 12384–12385, 2003.
- [116] V. Mekla, C. Juisuwannathat, and U. Tipparach, "The Growth of TiO₂ Nanostructures Prepared by Anodization in Combination with Hydrothermal Method on the Ti Foil," in *MATEC Web of Conferences, 4th International Conference on Material Science and Engineering Technology (ICMSET 2015)*, 2015, vol. 4, pp. 10–12.
- [117] Q. A. Nguyen, Y. V. Bhargava, and T. M. Devine, "Initiation of Organized Nanopore/Nanotube Arrays in Anodized Titanium Oxide: I. Criterion for Initiation," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 156, no. 3, pp. E55–E61, Mar. 2009.
- [118] J. M. Macak, H. Hildebrand, U. Marten-Jahns, and P. Schmuki, "Mechanistic aspects and growth of large diameter self-organized TiO₂ nanotubes," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 621, no. 2, pp. 254–266, 2008.
- [119] L. Sun, S. Zhang, X. W. Sun, and X. He, "Effect of electric field strength on the length of anodized titania nanotube arrays," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 637, no. 1–2, pp. 6–12, 2009.
- [120] A. Seyeux *et al.*, "Influence of Surface Condition on Nanoporous and Nanotubular Film Formation on Titanium," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 156, no. 2, p. K17, 2009.
- [121] V. Galstyan, A. Vomiero, E. Comini, G. Faglia, and G. Sberveglieri, "TiO₂ nanotubular and nanoporous arrays by electrochemical anodization on different substrates," *RSC Adv.*, vol. 1, no. 6, pp. 1038–1044, 2011.
- [122] R. Beranek, H. Hildebrand, and P. Schmuki, "Self-Organized Porous Titanium Oxide Prepared in H₂SO₄ / HF Electrolytes," *Electrochem. Solid-State Lett.*, vol. 6, no. 3, pp. B12–B14, Mar. 2003.
- [123] S. Bauer, S. Kleber, and P. Schmuki, "TiO₂ nanotubes: Tailoring the geometry in H₃PO₄/HF electrolytes," *Electrochem. commun.*, vol. 8, no. 8, pp. 1321–1325, 2006.

- [124] D. V Bavykin and F. C. Walsh, *Titanate and Titania Nanotubes - Synthesis, Properties and Applications*, no. 12. The Royal Society of Chemistry, 2010.
- [125] M. Wang, Y. Liu, and H. Yang, "A unified thermodynamic theory for the formation of anodized metal oxide structures," *Electrochim. Acta*, vol. 62, pp. 424–432, 2012.
- [126] S. Li, G. Zhang, D. Guo, L. Yu, and W. Zhang, "Anodization Fabrication of Highly Ordered TiO₂ Nanotubes," *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 29, pp. 12759–12765, 2009.
- [127] A. Haring, A. Morris, and M. Hu, "Controlling morphological parameters of anodized titania nanotubes for optimized solar energy applications," *Materials (Basel)*, vol. 5, no. 10, pp. 1890–1909, 2012.
- [128] G. K. Mor, O. K. Varghese, M. Paulose, N. Mukherjee, and C. A. Grimes, "Fabrication of tapered, conical-shaped titania nanotubes," *J. Mater. Res.*, vol. 18, no. 11, pp. 2588–2593, Nov. 2003.
- [129] Y.-Y. Song and P. Schmuki, "Modulated TiO₂ nanotube stacks and their use in interference sensors," 2010.
- [130] C. A. Grimes and G. K. Mor, "Fabrication of TiO₂ Nanotube Arrays by Electrochemical Anodization: Four Synthesis Generations BT - TiO₂ Nanotube Arrays: Synthesis, Properties, and Applications," C. A. Grimes and G. K. Mor, Eds. Boston, MA: Springer US, 2009, pp. 1–66.
- [131] D. Gong *et al.*, "Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation," *J. Mater. Res.*, vol. 16, no. 12, pp. 3331–3334, 2001.
- [132] S. Berger, R. Hahn, P. Roy, and P. Schmuki, "Self-organized TiO₂ nanotubes: Factors affecting their morphology and properties," *Phys. status solidi*, vol. 247, no. 10, pp. 2424–2435, Sep. 2010.
- [133] J. M. Macák, H. Tsuchiya, and P. Schmuki, "High-aspect-ratio TiO₂ nanotubes by anodization of titanium," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 14, pp. 2100–2102, 2005.
- [134] C. Richter, E. Panaitescu, R. Willey, and L. Menon, "Titania nanotubes prepared by anodization in fluorine-free acids," *J. Mater. Res.*, vol. 22, no. 6, pp. 1624–1631, Jun. 2007.
- [135] S. Yoriya, W. Kittimeeworakul, and N. Punprasert, "Effect of Anodization Parameters on Morphologies of TiO₂ Nanotube Arrays and Their Surface Properties," *J. Chem. Chem. Eng.*, vol. 6, pp. 686–691, 2012.
- [136] V. M. Prida *et al.*, "Temperature influence on the anodic growth of self-aligned Titanium dioxide nanotube arrays," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 316, no. 2, pp. 110–113, Sep. 2007.
- [137] D. Regonini, A. Satka, A. Jaroenworarluck, D. W. E. Allsopp, C. R. Bowen, and R. Stevens, "Factors influencing surface morphology of anodized TiO₂ nanotubes," *Electrochim. Acta*, vol. 74, pp. 244–253, 2012.
- [138] K. Yasuda, J. M. Macak, S. Berger, A. Ghicov, and P. Schmuki, "Mechanistic Aspects of the Self-Organization Process for Oxide Nanotube Formation on Valve Metals," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 154, no. 9, p. C472, 2007.
- [139] L. V. Taveira, J. M. Macák, H. Tsuchiya, L. F. P. Dick, and P. Schmuki, "Initiation and Growth

of Self-Organized TiO₂ Nanotubes Anodically Formed in NH₄F/(NH₄)₂SO₄ Electrolytes," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 152, no. 10, p. B405, 2005.

- [140] S. Sreekantan, K. A. Saharudin, and L. C. Wei, "Formation of TiO₂ nanotubes via anodization and potential applications for photocatalysts, biomedical materials, and photoelectrochemical cell," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 21, p. 12002, Mar. 2011.
- [141] K. Indira, U. K. Mudali, and T. N. N. Rajendran, "A Review on TiO₂ Nanotubes : Influence of Anodization Parameters , Formation Mechanism , Properties , Corrosion Behavior , and Biomedical Applications," *J. Bio- Tribo-Corrosion*, vol. 1, p. 28, 2015.
- [142] D. J. (David J. . Whitehouse, *Surfaces and their measurement*. Kogan Page Science, 2004.
- [143] B. Gun, S. Hong, J. Eun, and J. Choi, "Applied Surface Science Electropolishing for the formation of anodic nanotubular TiO₂ with uniform length and density," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 16, pp. 7190–7194, 2011.
- [144] K. Lu, Z. Tian, and J. A. Geldmeier, "Electrochimica Acta Polishing effect on anodic titania nanotube formation," *Electrochim. Acta*, vol. 56, no. 17, pp. 6014–6020, 2011.
- [145] M. Jarosz, J. K. B, M. J. B, and G. D. Sulka, "Effect of Different Polishing Methods on Anodic Titanium Dioxide Formation," vol. 2015, 2015.
- [146] J. Wang and Z. Lin, "Freestanding TiO₂ Nanotube Arrays with Ultrahigh Aspect Ratio via Electrochemical Anodization," *Chem. Mater.*, vol. 20, no. 4, pp. 1257–1261, Feb. 2008.
- [147] M. Paulose *et al.*, "TiO₂ Nanotube Arrays of 1000 μ m Length by Anodization of Titanium Foil: Phenol Red Diffusion," *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 41, pp. 14992–14997, 2007.
- [148] G. Liu, K. Wang, N. Hoivik, and H. Jakobsen, "Progress on free-standing and flow-through TiO₂ nanotube membranes," *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 98, no. August 2016, pp. 24–38, 2012.
- [149] D. R. Askeland, L. Baselga, and J. Bravo de Pedro, *Ciencia e ingeniería de los materiales*. Paraninfo, 2001.
- [150] D. Regonini, A. Jaroenworarluck, R. Stevens, and C. R. Bowen, "Effect of heat treatment on the properties and structure of TiO₂ nanotubes: Phase composition and chemical composition," *Surf. Interface Anal.*, vol. 42, no. 3, pp. 139–144, 2010.
- [151] A. Pimentel, D. Nunes, S. Pereira, R. Martins, and E. Fortunato, "Photocatalytic Activity of TiO₂ Nanostructured Arrays Prepared by Microwave-Assisted Solvothermal Method," in *Semiconductor Photocatalysis - Materials, Mechanisms and Applications*, InTech, 2016, pp. 81–103.
- [152] V. C. Anitha, D. Menon, S. V. Nair, and R. Prasanth, "Electrochemical tuning of titania nanotube morphology in inhibitor electrolytes," *Electrochim. Acta*, vol. 55, no. 11, pp. 3703–3713, 2010.
- [153] K. Shankar *et al.*, "A study on the spectral photoresponse and photoelectrochemical properties of flame-annealed titania nanotube-arrays," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 38, no. 18, pp. 3543–3549, Sep. 2005.
- [154] Y. C. Lim, Z. Zainal, M. Z. Hussein, and W. T. Tan, "The effect of heat treatment on phase

transformation, morphology and photoelectrochemical response of short TiO₂ nanotubes," *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, vol. 8, no. 1, pp. 167–176, 2012.

- [155] A. Jaroenworarluck, D. Regonini, C. R. Bowen, and R. Stevens, "A microscopy study of the effect of heat treatment on the structure and properties of anodised TiO₂ nanotubes," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 256, no. 9, pp. 2672–2679, 2010.
- [156] D. Velten, V. Biehl, F. Aubertin, B. Valeske, W. Possart, and J. Breme, "Preparation of TiO₂ layers on cp-Ti and Ti6Al4V by thermal and anodic oxidation and by sol-gel coating techniques and their characterization," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 59, no. 1, pp. 18–28, 2002.
- [157] M. Vera, A. Ares, D. Lamas, and C. Schvezov, "Preparación y Caracterización de Recubrimientos de Dióxido de Titanio Obtenidos por Oxidación Anódica de la Aleación Ti-6Al-4V. Primeros Resultados," *An. Afa*, vol. 20, pp. 178–183, 2008.
- [158] W. S. Rasband, "ImageJ," *U. S. National Institutes of Health*. Bethesda, Maryland, USA, 2016.
- [159] R Core Team, "R: A language and environment for statistical computingTitle." R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015.
- [160] S. Karthik *et al.*, "Highly-ordered TiO₂ nanotube arrays up to 220 um in length: use in water photoelectrolysis and dye-sensitized solar cells," *Nanotechnology*, vol. 18, no. 6, p. 65707, 2007.
- [161] T. Kasuga, M. Hiramatsu, A. Hoson, T. Sekino, and K. Niihara, "Titania Nanotubes Prepared by Chemical Processing," *Adv. Mater.*, vol. 11, no. 15, pp. 1307–1311, 1999.
- [162] G. H. Du, Q. Chen, R. C. Che, Z. Y. Yuan, and L. M. Peng, "Preparation and structure analysis of titanium oxide nanotubes," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 79, no. 22, pp. 3702–3704, 2001.
- [163] Y. Suzuki and S. Yoshikawa, "Synthesis and Thermal Analyses of TiO₂-Derived Nanotubes Prepared by the Hydrothermal Method," *J. Mater. Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 982–985, 2004.
- [164] J. H. Adair and E. Suvaci, "Submicron Electroceramic Powders by Hydrothermal Synthesis," *Encycl. Mater. Sci. Technol. (Second Ed.)*, pp. 8933–8937, 2001.
- [165] M. Á. López Zavala, S. A. Lozano Morales, and M. Ávila-Santos, "Synthesis of stable TiO₂ nanotubes: Effect of hydrothermal treatment, acid washing and annealing temperature," *Heliyon*, no. September, p. e00456, 2017.
- [166] J. Kunze, A. Seyeux, and P. Schmuki, "Anodic TiO₂ Layer Conversion: Fluoride-Induced Rutile Formation at Room Temperature," *Electrochem. Solid-State Lett.*, vol. 11, no. 2, pp. K11–K13, Feb. 2008.
- [167] Z. Su, L. Zhang, F. Jiang, and M. Hong, "Formation of crystalline TiO₂ by anodic oxidation of titanium," *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, vol. 23, no. 3, pp. 294–301, 2013.
- [168] D. Bresser *et al.*, "Carbon-Coated Anatase TiO₂ Nanotubes for Li- and Na-Ion Anodes," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 162, no. 2, pp. A3013–A3020, 2014.
- [169] H.-P. Lim *et al.*, "Hydroxyapatite Coating on TiO₂ Nanotube by Sol–Gel Method for Implant Applications," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 18, no. 2, pp. 1403–1405, 2018.

- [170] P. Van Viet *et al.*, "Silver nanoparticle loaded TiO₂ nanotubes with high photocatalytic and antibacterial activity synthesized by photoreduction method," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 352, pp. 106–112, 2018.
- [171] C. W. Lai and S. Sreekantan, "Photoelectrochemical performance of smooth TiO₂ nanotube arrays: Effect of anodization temperature and cleaning methods," *Int. J. Photoenergy*, vol. 2012, 2012.
- [172] D. Wang, Y. Liu, B. Yu, F. Zhou, and W. Liu, "TiO₂ nanotubes with tunable morphology, diameter, and length: synthesis and photo-electrical/catalytic performance," *Chem. Mater.*, vol. 21, no. 7, pp. 1198–1206, 2009.
- [173] H. Xu, Q. Zhang, C. Zheng, W. Yan, and W. Chu, "Application of ultrasonic wave to clean the surface of the TiO₂ nanotubes prepared by the electrochemical anodization," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 20, pp. 8478–8480, 2011.
- [174] K. Kant and D. Losic, "A simple approach for synthesis of TiO₂ nanotubes with through-hole morphology," *Phys. Status Solidi - Rapid Res. Lett.*, vol. 3, no. 5, pp. 139–141, 2009.
- [175] *Enciclopedia de ciencia y técnica*. Salvat, 1991.
- [176] C. D. E. Dasonomia, "Industrias Y." 2010.
- [177] B. Katona, L. Náday, A. Terdik, M. Weszl, P. Nagy, and E. Bognár, "Anodic Oxidation of Medical Grade Titanium," *Compos. Sci. Technol.*, pp. 1–6, 2010.
- [178] M. P. Neupane, I. S. Park, M. H. Lee, T. S. Bae, and F. Watari, "Influence of heat treatment on morphological changes of nano-structured titanium oxide formed by anodic oxidation of titanium in acidic fluoride solution," *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 19, no. 1, pp. 77–83, 2009.
- [179] J. Zhao, X. Wang, T. Sun, and L. Li, "Crystal phase transition and properties of titanium oxide nanotube arrays prepared by anodization," *J. Alloys Compd.*, vol. 434–435, no. SPEC. ISS., pp. 792–795, 2007.
- [180] O. K. Varghese, D. Gong, M. Paulose, C. a. Grimes, and E. C. Dickey, "Crystallization and high-temperature structural stability of titanium oxide nanotube arrays," *J. Mater. Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 156–165, 2003.
- [181] P. I. Gouma and M. J. Mills, "Anatase-to-Rutile Transformation in Titania Powders," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 84, no. 189042, pp. 619–22, 2001.
- [182] S. Venkatachalam, H. Hayashi, T. Ebina, and H. Nanjo, "Preparation and Characterization of Nanostructured TiO₂ Thin Films by Hydrothermal and Anodization Methods," in *Optoelectronics - Advanced Materials and Devices*, 2013, pp. 115–136.
- [183] B. G. Subhasish Chatterjee, Miriam Ginzberg, "Effect of anodization conditions on the synthesis of TiO₂ nanopores," *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, vol. 951, pp. 1–6, 2006.
- [184] X. Wen, M. Cao, J. Wu, J. Tao, Y. Sun, and N. Dai, "Morphology dependence of TiO₂ nanotube arrays on anodization variables and buffer medium," *J. Semicond.*, vol. 31, no. 6, pp. 2–7, 2010.
- [185] Z. Lewandowska, P. Piszczek, A. Radtke, T. Jedrzejewski, W. Kozak, and B. Sadowska, "The evaluation of the impact of titania nanotube covers morphology and crystal phase on their

biological properties," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 4, p. 163, 2015.

- [186] Z. B. Xie and D. J. Blackwood, "Effects of anodization parameters on the formation of titania nanotubes in ethylene glycol," *Electrochim. Acta*, vol. 56, no. 2, pp. 905–912, 2010.
- [187] D. Kowalski, D. Kim, and P. Schmuki, "TiO₂ nanotubes, nanochannels and mesosponge: Self-organized formation and applications," *Nano Today*, vol. 8, no. 3, pp. 235–264, 2013.
- [188] S. Khan, "Synthesis Of Highly Ordered Titanium Dioxide (TiO₂) Nanotubes: Impact Of Process Parameters," in *6th Annual GRASP Symposium*, 2010, pp. 35–36.
- [189] A. Hamlekhan *et al.*, "Fabrication of anti-aging TiO₂ nanotubes on biomedical Ti alloys," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, pp. 1–10, 2014.
- [190] H. Y. Si, Z. H. Sun, X. Kang, W. W. Zi, and H. L. Zhang, "Voltage-dependent morphology, wettability and photocurrent response of anodic porous titanium dioxide films," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 119, no. 1–3, pp. 75–81, 2009.
- [191] G. Li, Q. Zhao, H. Yang, and L. Cheng, "Antibacterial and Microstructure Properties of Titanium Surfaces Modified with Ag-Incorporated Nanotube Arrays," *Mater. Res.*, vol. 19, no. 3, pp. 735–740, 2016.
- [192] Y. H. An and R. J. Friedman, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 43, no. 3, pp. 338–348, 1998.
- [193] L. Zhao, P. K. Chu, Y. Zhang, and Z. Wu, "Antibacterial coatings on titanium implants," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 91B, no. 1, pp. 470–480, Oct. 2009.
- [194] S. L. Percival, K. E. Hill, S. Malic, D. W. Thomas, and D. W. Williams, "Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms," *Wound Repair Regen.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2011.
- [195] P. S. Stewart and J. W. Costerton, "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.," *Lancet (London, England)*, vol. 358, no. 9276, pp. 135–8, Jul. 2001.
- [196] B. D. Hoyle and J. W. Costerton, "Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms.," *Prog. Drug Res.*, vol. 37, pp. 91–105, 1991.
- [197] C. B. Phillips *et al.*, "Incidence rates of dislocation, pulmonary embolism, and deep infection during the first six months after elective total hip replacement.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 85–A, no. 1, pp. 20–6, Jan. 2003.
- [198] M. J. Spangehl, B. A. Masri, J. X. O'Connell, and C. P. Duncan, "Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 81, no. 5, pp. 672–83, May 1999.
- [199] A. B. Wymenga, J. R. van Horn, A. Theeuwes, H. L. Muytjens, and T. J. Slooff, "Perioperative factors associated with septic arthritis after arthroplasty. Prospective multicenter study of 362 knee and 2,651 hip operations.," *Acta Orthop. Scand.*, vol. 63, no. 6, pp. 665–71, Dec. 1992.
- [200] D. T. Tsukayama, R. Estrada, and R. B. Gustilo, "Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 78,

no. 4, pp. 512–23, Apr. 1996.

- [201] W. Zimmerli and P. E. Ochsner, "Management of Infection Associated with Prosthetic Joints," *Infection*, vol. 31, no. 2, pp. 99–108, Mar. 2003.
- [202] V. H. Chu *et al.*, "Staphylococcus aureus bacteremia in patients with prosthetic devices: Costs and outcomes," *Am. J. Med.*, vol. 118, no. 12, p. 1416.e19-1416.e24, Dec. 2005.
- [203] C. Roberts *et al.*, "Characterizing the effect of the Staphylococcus aureus virulence factor regulator, SarA, on log-phase mRNA half-lives," *J. Bacteriol.*, vol. 188, no. 7, pp. 2593–603, Apr. 2006.
- [204] I. Izquierdo-Barba *et al.*, "Nanocolumnar coatings with selective behavior towards osteoblast and Staphylococcus aureus proliferation," *Acta Biomater.*, vol. 15, pp. 20–28, Mar. 2015.
- [205] D. Mack, A. P. Davies, L. G. Harris, H. Rohde, M. A. Horstkotte, and J. K.-M. Knobloch, "Microbial interactions in Staphylococcus epidermidis biofilms," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 387, no. 2, pp. 399–408, Jan. 2007.
- [206] F. Götz, "Staphylococcus and biofilms," *Mol. Microbiol.*, vol. 43, no. 6, pp. 1367–78, Mar. 2002.
- [207] A. Lee and H.-L. Wang, "Biofilm Related to Dental Implants," *Implant Dent.*, vol. 19, no. 5, pp. 387–393, Oct. 2010.
- [208] K. Hori and S. Matsumoto, "Bacterial adhesion: From mechanism to control," *Biochem. Eng. J.*, vol. 48, no. 3, pp. 424–434, Feb. 2010.
- [209] M. Katsikogianni and Y. F. Missirlis, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions," *Eur. Cell. Mater.*, vol. 8, pp. 37–57, Dec. 2004.
- [210] M. Quirynen *et al.*, "An in vivo Study of the Influence of the Surface Roughness of Implants on the Microbiology of Supra- and Subgingival Plaque," *J. Dent. Res.*, vol. 72, no. 9, pp. 1304–1309, Sep. 1993.
- [211] T. R. Scheuerman, A. K. Camper, and M. A. Hamilton, "Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 208, no. 1, pp. 23–33, Dec. 1998.
- [212] W. Teughels, N. Van Assche, I. Sliepen, and M. Quirynen, "Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 17, no. S2, pp. 68–81, Oct. 2006.
- [213] K. Subramani, R. E. Jung, A. Molenberg, and C. H. F. Hammerle, "Biofilm on dental implants: a review of the literature," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 24, no. 4, pp. 616–26.
- [214] J. Hasan and K. Chatterjee, "Recent advances in engineering topography mediated antibacterial surfaces," *Nanoscale*, vol. 7, no. 38, pp. 15568–75, Oct. 2015.
- [215] M. Quirynen and C. M. Bollen, "The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–14, Jan. 1995.

- [216] C. M. Bollen, P. Lambrechts, and M. Quirynen, "Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature," *Dent. Mater.*, vol. 13, no. 4, pp. 258–69, Jul. 1997.
- [217] B.-C. Lee, G.-Y. Jung, D.-J. Kim, and J.-S. Han, "Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia *in vitro*," *J. Adv. Prosthodont.*, vol. 3, no. 2, p. 81, Jun. 2011.
- [218] W. R. Lacefield, "Materials Characteristics of Uncoated/Ceramic-Coated Implant Materials," *Adv. Dent. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 21–26, Jun. 1999.
- [219] T. Albrektsson, T. Berglundh, and J. Lindhe, *Osseointegration: historic background and current concepts*. 2003.
- [220] X. Li, "Bactericidal mechanism of nanopatterned surfaces," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 2, pp. 1311–1316, Dec. 2016.
- [221] J. E. Ellingsen, P. Thomsen, and S. P. Lyngstadaas, "Advances in dental implant materials and tissue regeneration," *Periodontol. 2000*, vol. 41, no. 1, pp. 136–156, Jun. 2006.
- [222] D. Buser *et al.*, "Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 75–83, May 1999.
- [223] A. Wennerberg, T. Albrektsson, C. Johansson, and B. Andersson, "Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography," *Biomaterials*, vol. 17, no. 1, pp. 15–22, Jan. 1996.
- [224] K. T. Bowers, J. C. Keller, B. A. Randolph, D. G. Wick, and C. M. Michaels, "Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 7, no. 3, pp. 302–10, 1992.
- [225] A. Wennerberg, T. Albrektsson, and J. Lausmaa, "Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75-microns-sized particles of Al₂O₃," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 30, no. 2, pp. 251–60, Feb. 1996.
- [226] L. J., "Mechanical, Thermal, Chemical and Electrochemical Surface Treatment of Titanium," in *Titanium in Medicine*, Engineering, Springer, Berlin, Heidelberg, 2001.
- [227] C. M. Pypen, H. Plenk, M. F. Ebel, R. Svagera, and J. Wernisch, "Characterization of microblasted and reactive ion etched surfaces on the commercially pure metals niobium, tantalum and titanium," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 8, no. 12, pp. 781–4, Dec. 1997.
- [228] D. J. Weber and W. A. Rutala, "Self-disinfecting surfaces: Review of current methodologies and future prospects," *Am. J. Infect. Control*, vol. 41, no. 5 SUPPL., pp. S31–S35, 2013.
- [229] J. C. Tiller, C.-J. Liao, K. Lewis, and A. M. Klibanov, "Designing surfaces that kill bacteria on contact," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 11, pp. 5981–5985, 2001.
- [230] L. Bai *et al.*, "Nanostructured titanium–silver coatings with good antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by one-step magnetron sputtering," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 355, pp. 32–44, Nov. 2015.
- [231] A. Arunachalam, S. Dhanapandian, C. Manoharan, and G. Sivakumar, "Physical properties of Zn doped TiO₂ thin films with spray pyrolysis technique and its effects in antibacterial

- activity," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 138, pp. 105–112, Mar. 2015.
- [232] X. Yao, X. Zhang, H. Wu, L. Tian, Y. Ma, and B. Tang, "Microstructure and antibacterial properties of Cu-doped TiO₂ coating on titanium by micro-arc oxidation," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 292, pp. 944–947, Feb. 2014.
- [233] J. W. Molling, J. W. Seezink, B. E. J. Teunissen, I. Muijers-Chen, and P. J. A. Borm, "Comparative performance of a panel of commercially available antimicrobial nanocoatings in Europe," *Nanotechnol. Sci. Appl.*, vol. 7, pp. 97–104, 2014.
- [234] L. Zhao *et al.*, "Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 32, no. 24, pp. 5706–5716, Aug. 2011.
- [235] J. Sun, J. Liu, X. Liu, and J. Sun, "Antimicrobial and osteogenic effect of Ag-implanted titanium with a nanostructured surface," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, p. 875, Feb. 2012.
- [236] J. A. Lemire, J. J. Harrison, and R. J. Turner, "Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, no. 6, pp. 371–384, Jun. 2013.
- [237] L. G. Ovington, "The truth about silver.," *Ostomy. Wound. Manage.*, vol. 50, no. 9A Suppl, p. 1S–10S, Sep. 2004.
- [238] M. L. W. Knetsch and L. H. Koole, "New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles," *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 4, pp. 340–366, Jan. 2011.
- [239] M. S. Hassan, T. Amna, H. Y. Kim, and M.-S. Khil, "Enhanced bactericidal effect of novel CuO/TiO₂ composite nanorods and a mechanism thereof," *Compos. Part B Eng.*, vol. 45, no. 1, pp. 904–910, Feb. 2013.
- [240] K. Li, Y. Xie, L. Huang, H. Ji, and X. Zheng, "Antibacterial mechanism of plasma sprayed Ca₂ZnSi₂O₇ coating against Escherichia coli," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 1, pp. 171–178, Jan. 2013.
- [241] OECD, "Guidance Document for Quantitative Method for Evaluating Antibacterial Activity of Porous and Non-Porous Antibacterial Treated Materials," *Jt. Meet. Chem. Comm. Work. Party Chem. Pestic. Biotechnol. Env/Jm/Mono*, vol. 18, no. 202, 2014.
- [242] L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, and R. G. Richards, "Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(l-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4135–4148, Aug. 2004.
- [243] C. C. P. M. Verheyen, W. J. A. Dhert, J. M. A. de Bleeck-Hogervorst, T. J. K. van der Reijden, P. L. C. Petit, and K. de Groot, "Adherence to a metal, polymer and composite by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis," *Biomaterials*, vol. 14, no. 5, pp. 383–391, Apr. 1993.
- [244] J. Hasan *et al.*, "Selective bactericidal activity of nanopatterned superhydrophobic cicada Psaltoda claripennis wing surfaces," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 20, pp. 9257–9262, Oct. 2013.

- [245] S. Pogodin *et al.*, "Biophysical model of bacterial cell interactions with nanopatterned cicada wing surfaces.," *Biophys. J.*, vol. 104, no. 4, pp. 835–40, Feb. 2013.
- [246] L. G. Harris and R. G. Richards, "Staphylococcus aureus adhesion to different treated titanium surfaces," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 15, no. 4, pp. 311–314, 2004.
- [247] R. Bos, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher, "Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 23, no. 2, pp. 179–230, Apr. 1999.
- [248] N. J. Hallab, K. J. Bundy, K. O'Connor, R. L. Moses, and J. J. Jacobs, "Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 1, pp. 55–71, Feb. 2001.
- [249] J. Tsibouklis *et al.*, "Preventing bacterial adhesion onto surfaces: the low-surface-energy approach," *Biomaterials*, vol. 20, no. 13, pp. 1229–1235, Jul. 1999.
- [250] I. Yoda, H. Koseki, M. Tomita, T. Shida, H. Horiuchi, and H. Sakoda, "Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion," *BMC Microbiol.*, vol. 14, pp. 1–7, 2014.
- [251] S. A. Hacking *et al.*, "Surface roughness enhances the osseointegration of titanium headposts in non-human primates," *J. Neurosci. Methods*, vol. 211, no. 2, pp. 237–244, Nov. 2012.
- [252] M.-Y. Lan, C.-P. Liu, H.-H. Huang, and S.-W. Lee, "Both Enhanced Biocompatibility and Antibacterial Activity in Ag-Decorated TiO₂ Nanotubes," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e75364, Oct. 2013.
- [253] K. C. Popat, M. Eltgroth, T. J. LaTempa, C. A. Grimes, and T. A. Desai, "Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes," *Biomaterials*, vol. 28, no. 32, pp. 4880–4888, Nov. 2007.
- [254] G. Eaninwene, C. Yao, T. J. Webster, and T. J. Webster, "Enhanced osteoblast adhesion to drug-coated anodized nanotubular titanium surfaces.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 3, no. 2, pp. 257–64, 2008.
- [255] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, and J. O. Kim, "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 662–8, Dec. 2000.
- [256] C. Greulich *et al.*, "The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range," *RSC Adv.*, vol. 2, no. 17, p. 6981, Jul. 2012.
- [257] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, 2009.
- [258] X. Chen and H. J. Schluesener, "Nanosilver: A nanoproduct in medical application," *Toxicol. Lett.*, vol. 176, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2008.
- [259] S. W. P. Wijnhoven *et al.*, "Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment," *Nanotoxicology*, vol. 3, no. 2, pp. 109–138, Jan. 2009.

- [260] G. Mendonça, D. B. S. Mendonça, and F. J. L. Araga, "Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 3822–3835, 2008.
- [261] Y. Jeong, E. Kim, W. A. Brantley, and H. Choe, "Morphology of hydroxyapatite nanoparticles in coatings on nanotube-formed Ti e Nb e Zr alloys for dental implants," *Vaccum*, vol. 107, pp. 297–303, 2014.
- [262] L. Salou, A. Hoornaert, G. Louarn, and P. Layrolle, "Enhanced osseointegration of titanium implants with nanostructured surfaces : An experimental study in rabbits," *Acta Biomater.*, vol. 11, pp. 494–502, 2015.
- [263] S. Ban, Y. Iwaya, H. Kono, and H. Sato, "Surface modification of titanium by etching in concentrated sulfuric acid," vol. 2, pp. 1115–1120, 2005.
- [264] H. J. R, S. P. Lyngstadaas, and J. E. Ellingsen, "Analysing the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test," vol. 24, pp. 4559–4564, 2003.
- [265] M. M. Shalabi, A. Gortemaker, and M. A. Van Hof, "CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE Implant Surface Roughness and Bone Healing :," pp. 496–500, 2005.
- [266] D. M. D. Ehrenfest, P. G. Coelho, B. Kang, Y. Sul, and T. Albrektsson, "Classification of osseointegrated implant surfaces : materials , chemistry and topography," *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 4, pp. 198–206, 2010.
- [267] N. G. Durmus and T. J. Webster, "Nanostructured titanium : the ideal material for improving orthopedic implant efficacy ? E ditorial," pp. 791–793, 2012.
- [268] V. V. D. Rani, L. Vinoth-kumar, V. C. Anitha, K. Manzoor, M. Deepthy, and V. N. Shantikumar, "Osteointegration of titanium implant is sensitive to specific nanostructure morphology," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 5, pp. 1976–1989, 2012.
- [269] D. Khang, J. Lu, C. Yao, K. M. Haberstroh, and T. J. Webster, "The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium," vol. 29, pp. 970–983, 2008.
- [270] C. E. Orsello, D. A. Lauffenburger, and D. A. Hammer, "Molecular properties in cell adhesion: a physical and engineering perspective," *Trends Biotechnol.*, vol. 19, no. 8, pp. 310–316, Aug. 2001.
- [271] M. Mîndroiu, C. Pirvu, R. Ion, and I. Demetrescu, "Comparing performance of nanoarchitectures fabricated by Ti6Al7Nb anodizing in two kinds of electrolytes," *Electrochim. Acta*, vol. 56, pp. 193–202, 2010.
- [272] S. Minagar, C. C. Berndt, J. Wang, E. Ivanova, and C. Wen, "A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 8, pp. 2875–2888, 2012.
- [273] H. Aita *et al.*, "The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone," *Biomaterials*, vol. 30, no. 6, pp. 1015–1025, 2009.
- [274] T. Saito *et al.*, "Suppressed proliferation of mouse osteoblast-like cells by a rough-surfaced substrate leads to low differentiation and mineralization," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 1, pp. 1–7, 2010.

- [275] J. Y. Park, C. H. Gemmell, and J. E. Davies, "Platelet interactions with titanium : modulation of platelet activity by surface topography," vol. 22, pp. 2671–2682, 2001.
- [276] A. Cheng, A. Humayun, D. J. Cohen, B. D. Boyan, and Z. Schwartz, "Additively manufactured 3D porous Ti-6Al-4V constructs mimic trabecular bone structure and regulate osteoblast proliferation, differentiation and local factor production in a porosity and surface roughness dependent manner," *Biofabrication*, vol. 6, no. 4, 2014.
- [277] E. M. Hewett, K. Smith, K. Gall, and B. D. Boyan, "Change in Surface Roughness by Dynamic Shape-Memory Acrylate Networks Enhances Osteoblast Differentiation," *Biomaterials*, 2016.
- [278] O. Andrukhov *et al.*, "Proliferation , behavior , and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness," *Dent. Mater.*, vol. 32, no. 11, pp. 1374–1384, 2016.
- [279] S. A. Redey *et al.*, "Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 50, no. 3, pp. 353–64, Jun. 2000.
- [280] B. Feng, J. Weng, B. C. Yang, S. X. Qu, and X. D. Zhang, "Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast.," *Biomaterials*, vol. 24, no. 25, pp. 4663–70, Nov. 2003.
- [281] H.-W. Kim, J. C. Knowles, V. Salih, and H.-E. Kim, "Hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite layered film on titanium processed by a sol-gel route for hard-tissue implants," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 71B, no. 1, pp. 66–76, Oct. 2004.
- [282] S. Oh, C. Daraio, L.-H. Chen, T. R. Pisanic, R. R. Fiñones, and S. Jin, "Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 78A, no. 1, pp. 97–103, Jul. 2006.
- [283] R. MacBarb, D. Lindsey, C. Bahney, S. Woods, M. Wolfe, and S. Yerby, "Fortifying the Bone-Implant Interface Part 1: An In Vitro Evaluation of 3D-Printed and TPS Porous Surfaces," *Int. J. Spine Surg.*, vol. 11, no. 3, pp. 105–115, Jun. 2017.
- [284] S.-C. Qiao, J. Du, J.-M. Zhao, J.-Y. Shi, Y.-X. Gu, and H.-C. Lai, "Effects of a Hydroxyapatite-Coated Nanotube Surface of Titanium on MC3T3-E1 Cells," *Implant Dent.*, p. 1, Feb. 2015.
- [285] H. Orimo, "The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease.," *J. Nippon Med. Sch.*, vol. 77, no. 1, pp. 4–12, Feb. 2010.
- [286] N. S. Fedarko, P. Bianco, U. Vetter, and P. G. Robey, "Human bone cell enzyme expression and cellular heterogeneity: Correlation of alkaline phosphatase enzyme activity with cell cycle," *J. Cell. Physiol.*, vol. 144, no. 1, pp. 115–121, Jul. 1990.
- [287] E. E. Golub and K. Boesze-Battaglia, "The role of alkaline phosphatase in mineralization," *Curr. Opin. Orthop.*, vol. 18, no. 5, pp. 444–448, Sep. 2007.
- [288] H. J. Donahue, Z. Li, Z. Zhou, and C. E. Yellowley, "Differentiation of human fetal osteoblastic cells and gap junctional intercellular communication.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 278, no. 2, pp. C315–22, 2000.
- [289] R. Rodrigues-Ribeiro, É. C. Alvarenga, M. L. Calio, E. J. Paredes-Gamero, and A. T. Ferreira, "Dual Role of P2 Receptors during Osteoblast Differentiation," *Cell Biochem. Biophys.*, vol.

71, no. 2, pp. 1225–1233, Mar. 2015.

- [290] E. Nakamura *et al.*, “ATP activates DNA synthesis by acting on P2X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells,” *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 279, no. 2, pp. C510–C519, Aug. 2000.
- [291] A. Hoeberitz, S. Mahendran, G. Burnstock, and T. R. Arnett, “ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: A novel role for the P2Y₂ receptor in bone remodeling,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 86, no. 3, pp. 413–419, 2002.
- [292] I. R. Orriss *et al.*, “Extracellular Nucleotides Block Bone Mineralization *in Vitro* : Evidence for Dual Inhibitory Mechanisms Involving Both P2Y₂ Receptors and Pyrophosphate,” *Endocrinology*, vol. 148, no. 9, pp. 4208–4216, Sep. 2007.
- [293] T. A. Owen *et al.*, “Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 143, no. 3, pp. 420–430, 1990.
- [294] L. Xia *et al.*, “In vitro and in vivo studies of surface-structured implants for bone formation,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 4873–81, 2012.
- [295] M. Gleiche, L. F. Chi, and H. Fuchs, “Nanosopic channel lattices with controlled anisotropic wetting,” *Nature*, vol. 403, no. 6766, pp. 173–175, Jan. 2000.
- [296] S. Oh *et al.*, “Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 7, pp. 2130–2135, Feb. 2009.
- [297] S. Mollazadeh, J. Javadpour, and A. Khavandi, “In situ synthesis and characterization of nano-size hydroxyapatite in poly(vinyl alcohol) matrix,” *Ceram. Int.*, vol. 33, no. 8, pp. 1579–1583, Dec. 2007.
- [298] E. Nejati, V. Firouzdar, M. B. Eslaminejad, and F. Bagheri, “Needle-like nano hydroxyapatite/poly(l-lactide acid) composite scaffold for bone tissue engineering application,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 3, pp. 942–949, Apr. 2009.
- [299] L. C. Mendes, G. L. Ribeiro, and R. C. Marques, “In Situ Hydroxyapatite Synthesis: Influence of Collagen on Its Structural and Morphological Characteristic,” *Mater. Sci. Appl.*, vol. 3, no. 8, pp. 580–586, Aug. 2012.
- [300] J. Faig-Martí and F. J. Gil-Mur, “Los recubrimientos de hidroxiapatita en las prótesis articulares,” *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.*, vol. 52, no. 2, pp. 113–120, 2008.
- [301] J. Takebe, S. Itoh, J. Okada, and K. Ishibashi, “Anodic oxidation and hydrothermal treatment of titanium results in a surface that causes increased attachment and altered cytoskeletal morphology of rat bone marrow stromal cells in vitro,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 398–407, Sep. 2000.
- [302] K. S. Raja, M. Misra, and K. Paramguru, “Deposition of calcium phosphate coating on nanotubular anodized titanium,” *Mater. Lett.*, vol. 59, no. 17, pp. 2137–2141, Jul. 2005.
- [303] L.-Y. Huang, K.-W. Xu, and J. Lu, “A study of the process and kinetics of electrochemical deposition and the hydrothermal synthesis of hydroxyapatite coatings,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 11, no. 11, pp. 667–673, 2000.

- [304] T. Miyazaki and M. Kawashita, "Electrochemical deposition of Hydroxyapatite and its biomedical applications," in *Hydroxyapatite Coatings for Biomedical Applications*, 2013, p. 469.
- [305] S. R. Paital and N. B. Dahotre, "Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 66, no. 1–3, pp. 1–70, Aug. 2009.
- [306] J. . Zhang, C. . Lin, Z. . Feng, and Z. . Tian, "Mechanistic studies of electrodeposition for bioceramic coatings of calcium phosphates by an in situ pH-microsensor technique," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 452, no. 2, pp. 235–240, Jul. 1998.
- [307] X. Zhu, D. W. Son, J. L. Ong, and K. Kim, "Characterization of hydrothermally treated anodic oxides containing Ca and P on titanium," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 14, no. 7, pp. 629–634, 2003.
- [308] T. Webster *et al.*, "Decreased Staphylococcus aureus and increased osteoblast density on nanostructured electrophoretic-deposited hydroxyapatite on titanium without the use of pharmaceuticals," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, p. 1775, Apr. 2014.
- [309] R. Baptista *et al.*, "Characterization of titanium – hydroxyapatite biocomposites," *Bull. Mater. Sci.*, vol. 39, no. 1, pp. 263–272, 2016.
- [310] K.-Y. Hung, H.-C. Lai, Y.-C. Yang, and H.-P. Feng, "Characterization of Hydroxyapatite (HA) Sputtering Targets by APS Methods," *Coatings*, vol. 7, no. 11, p. 197, 2017.
- [311] A. Montenero, G. Gnappi, F. Ferrari, M. Cesari, and E. Salvioli, "Sol-gel derived hydroxyapatite coatings," vol. 5, pp. 2791–2797, 2000.
- [312] I. Š. Rončević, Z. Grubač, and M. Metikoš-Huković, "Electrodeposition of hydroxyapatite coating on AZ91D magnesium alloy for biomaterial applicationB.pdf," *Int. J. Electrochemical Sci.*, vol. 9, pp. 5907–5923, 2014.
- [313] R. Rodriguez, K. Kim, and J. L. Ong, "In vitro osteoblast response to anodized titanium and anodized titanium followed by hydrothermal treatment.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 65, no. 3, pp. 352–358, 2003.
- [314] A. Kar, K. S. Raja, and M. Misra, "Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO₂ for implant applications," *Surf. Coat. Technol.*, vol. 201, pp. 3723–3731, 2006.
- [315] M. Schlesinger and M. Paunovic, *Modern electroplating*, vol. 55. John Wiley & Sons, 2011.
- [316] A. Boccaccini and I. Zhitomirsky, "Application of electrophoretic and electrolytic deposition techniques in ceramics processing," *Curr. Opin. Solid State Mater.*, 2002.
- [317] R. I. M. Asri, W. S. W. Harun, M. A. Hassan, S. A. C. Ghani, and Z. Buyong, "A Review of Hydroxyapatite-based Coating Techniques: Sol-gel and Electrochemical Depositions on Biocompatible Metals," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, p. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.11.031>, 2015.
- [318] Z. Xuhui, Y. Lingfang, Z. Yu, and J. XIONG, "Hydroxyapatite coatings on titanium prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid," *Chinese J. Chem.*, 2009.
- [319] M. C. Kuo and S. K. Yen, "The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings

on biomedical titanium at room temperature,” vol. 20, pp. 153–160, 2002.

- [320] M. Popa, J. Moreno, M. Popa, and E. Vasilescu, “Electrochemical deposition of bioactive coatings on Ti and Ti–6Al–4V surfaces,” *Surf. Coatings*, 2011.
- [321] M. Chandrasekar and M. Pushpavanam, “Pulse and pulse reverse plating—Conceptual, advantages and applications,” *Electrochim. Acta*, 2008.
- [322] D. Blackwood and K. Seah, “Galvanostatic pulse deposition of hydroxyapatite for adhesion to titanium for biomedical purposes,” *Mater. Sci. Eng. C*, 2010.
- [323] S. Ban and S. Maruno, “Hydrothermal – electrochemical deposition of hydroxyapatite,” 1998.
- [324] E. Mohseni, E. Zalnezhad, and A. Bushroa, “Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti–6Al–4V implant: A review paper,” *Int. J. Adhes.*, 2014.
- [325] P. Anitha and H. M. Pandya, “Comprehensive Review of Preparation Methodologies of Nano Hydroxyapatite,” *J. Environ. Nanotechnol.*, vol. 3, no. 1, pp. 101–121, 2014.
- [326] H. Chen *et al.*, “Construction of surface HA / TiO₂ coating on porous titanium scaffolds and its preliminary biological evaluation,” *Mater. Sci. Eng. C*, 2016.
- [327] X. Li *et al.*, “Modified surface morphology of a novel Ti – 24Nb – 4Zr – 7 . 9Sn titanium alloy via anodic oxidation for enhanced interfacial biocompatibility and osseointegration,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 144, pp. 265–275, 2016.
- [328] Y. Parcharoen, P. Termsuksawad, and S. Sirivisoot, “Improved Bonding Strength of Hydroxyapatite on Titanium Dioxide Nanotube Arrays following Alkaline Pretreatment for Orthopedic Implants,” *J. Nanomater.*, vol. 2016, 2016.
- [329] P. C. Rath, L. Besra, B. P. Singh, and S. Bhattacharjee, “Titania/hydroxyapatite bi-layer coating on Ti metal by electrophoretic deposition : Characterization and corrosion studies,” *Ceram. Int.*, vol. 38, no. 4, pp. 3209–3216, 2012.
- [330] S. Liu, H. Li, Y. Su, Q. Guo, and L. Zhang, “Preparation and properties of in-situ growth of carbon nanotubes reinforced hydroxyapatite coating for carbon/carbon composites,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 70, pp. 805–811, 2017.

Anexo A: Publicaciones y Patentes



FORMULARIO DE DIVULGACION DE INVENCION – FDI

DIRECCION DE VINCULACIÓN TECNOLOGIA - CONICET

La siguiente información es necesaria para que la Dirección de Vinculación Tecnológica (DVT) realice una evaluación sobre la factibilidad de protección intelectual y una evaluación económica de los resultados de investigación informados, como así también un análisis adecuado de su posible comercialización. Por favor sea detallado y específico en las respuestas; adjunte fotos, dibujos, u otro material relevante para la evaluación.

Nombres de el/los investigador(es) que contribuyeron en la invención: Betiana Felice, Juan Manuel Sánchez Acosta, Gonzalo Ramos Ruiz, Gabriela Simonelli, Nicolás Nieva, Luciano Sappia, Alejandra Sánchez, Andrea Rodríguez, Carmelo José Felice

RESUMEN DE LA INVENCION CON FINES DE COMERCIALIZACION – Información No confidencial (Este resumen será utilizado a fin de captar potenciales interesados. Por aporte por favor un resumen de la invención, su campo de aplicación, ventajas/beneficios, y en el cual no se describan características de la invención que permitan su reproducción)

Presentamos un sensor de pH fácilmente replicable a gran escala, que puede soportar hasta 500°C, y sumamente robusto. Puede integrarse a sistemas RFID para monitoreo de alimentos, ser descartable para aplicaciones industriales y/o biomédicas, tales como monitoreo de heridas, órganos para transplante, jugos de frutas en tachos industriales, productos durante la esterilización, cultivos Batch, transporte de alimentos sólidos y líquidos. El sensor es fabricado integrando técnicas de fabricación hidrotérmicas y de electrospinning, para la obtención de nanoestructuras sensibles al pH.

CONICET



FORMULARIO DE DIVULGACION DE INVENCION – FDI

DIRECCION DE VINCULACIÓN TECNOLOGIA - CONICET

La siguiente información es necesaria para que la Dirección de Vinculación Tecnológica (DVT) realice una evaluación sobre la factibilidad de protección intelectual y una evaluación económica de los resultados de investigación informados, como así también un análisis adecuado de su posible comercialización. Por favor sea detallado y específico en las respuestas; adjunte fotos, dibujos, u otro material relevante para la evaluación.

Nombres de el/los investigador(es) que contribuyeron en la invención: Betiana Felice; María Alejandra Sánchez; Andrea Paola Rodríguez; Carmelo José Felice;

RESUMEN DE LA INVENCION CON FINES DE COMERCIALIZACION – Información No confidencial (Este resumen será utilizado a fin de captar potenciales interesados. Por aporte por favor un resumen de la invención, su campo de aplicación, ventajas/beneficios, y en el cual no se describan características de la invención que permitan su reproducción)

En Argentina, la industria implantológica se expandió considerablemente en los últimos tiempos. Esto se debe principalmente a que la cantidad de pacientes con implantes dentales se ha duplicado en los últimos diez años dada la creciente demanda de soluciones odontológicas estéticas. Este incremento lleva de la mano, sin embargo, el aumento de la cantidad de pacientes que requieren regeneración del tejido óseo debido a dos posibles causas: (1) Pérdida de tejido óseo por una infección que impide la colocación de un nuevo implante o (2) pérdida de tejido óseo causada por un implante fallido que debe ser retirado. En ambos casos, la solución implica rellenar la zona afectada con material osteoactivo seguida de aislación de la misma con una membrana que actúa como barrera entre la región donde debe regenerarse nuevamente tejido óseo de la región donde debe regenerarse tejido gingival. Tal técnica quirúrgica es conocida como regeneración tisular guiada (RTG).

Hasta el momento, las barreras para RTG que actualmente se pueden encontrar en el mercado argentino son principalmente membranas de colágeno de origen natural (nacionales e importadas), las cuales lamentablemente se degradan en corto tiempo -generalmente antes alcanzar regeneración completa de la zona dañada- además de ser susceptibles a infecciones las cuales pueden implicar segundas cirugías para solucionar los inconvenientes causados. En nuestro laboratorio desarrollamos una membrana sintética biocompatible para RTG capaz de no sólo de lo que las ya comercializadas membranas ofrecen sino también de ejercer activamente un efecto antibacteriano sobre la zona dañada -reduciendo en un 99% la carga bacteriana- además de activamente acelerar la síntesis ósea de forma tal de reducir los tiempos de curado para cada paciente sin riesgos de degradación temprana de las membranas o efectos alérgicos como los producidos por membranas de origen natural.

Effect of CaTiO_3 - CaCO_3 prepared by alkoxide method on cell response

Andrea P. Rodriguez,¹ Miho Inoue,¹ Toshiyuki Tanaka,² Michihiro Miyake,² Ana M. Sfer,³ Etsuo Kishimoto,⁴ Hidetsugu Tsujigiwa,⁵ Rosario S. Rivera,¹ Hitoshi Nagatsuka¹

¹Department of Oral Pathology and Medicine, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, Japan

²Department of Material and Energy Science, Graduate School of Environmental Science, Okayama University, Okayama, Japan

³Department of Mathematics, Probability and Statistic, College of Exacts Science and Technology, Tucuman University, Tucuman, Argentina

⁴Department of Oral Health, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, Japan

⁵Department of Virology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, Japan

Received 4 December 2008; revised 22 February 2009; accepted 4 April 2009

Published online 26 June 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.32551

Abstract: In recent years, calcium titanate (CaTiO_3) and carbon-containing materials have gained much attention in a number of biomedical material researches. To maximize the advantages of both materials, we developed a novel alkoxide method to get "calcium titanate with calcium carbonate" (CaTiO_3 - CaCO_3). The objective was to evaluate the crystallinity and elemental composition of CaTiO_3 - CaCO_3 prepared by alkoxide method, CaTiO_3 - αC elaborated by modified thermal decomposition method, commercially-prepared CaTiO_3 , and the effect of these materials on the bone marrow stromal cell. Hydroxyapatite was used as positive control material. We examined the cellular proliferation, osteoblastic differentiation, and mineralization of KUSA/A1 cells cultured with the materials. The results showed that CaTiO_3 -

CaCO_3 and CaTiO_3 - αC contained evidence of calcium carbonate enhancing cell proliferation, osteoblastic differentiation, and mineralization. On the contrary, the commercially-prepared CaTiO_3 revealed absence of calcium carbonate with lower cell response than the other groups. The results indicated that calcium carbonate could play a key role in the cell response of CaTiO_3 material. In conclusion, our findings suggest that CaTiO_3 - CaCO_3 could be considered an important candidate as a biomaterial for medical and dental applications. © 2009 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 93A: 297–303, 2010

Key words: carbonate; cell culture; osteoblast; particles; calcium titanate

INTRODUCTION

Titanium and its alloys have been widely used as biomedical and dental materials because of their excellent biocompatibility¹ and good mechanical

properties.² However, one disadvantage is the long period of obtaining good adhesion between the material and bone. Various bioactive coating materials have been developed to overcome this disadvantage.

In recent years, calcium titanate (CaTiO_3) material has gained much attention in a number of researches in biomedical materials. For instance, CaTiO_3 promoted osteoblast adhesion and proliferation.^{3,4} We also proposed CaTiO_3 - αC as an intermediate film, which improves adhesion between hydroxyapatite (HA) and substrate by modified thermal decomposition method.⁵ Further investigations suggested that CaTiO_3 has potential biomedical applications.⁶ To obtain CaTiO_3 coating, several surface modification techniques have been developed, such as sol-gel,^{6,7} hydrothermal reaction,⁸ radiofrequency and

Correspondence to: H. Nagatsuka; e-mail: jin@md.okayama-u.ac.jp

Contract grant sponsor: Grant-in-Aid for JSPS Postdoctoral Fellowship for Foreign Research; contract grant number: 1907217

Contract grant sponsor: Grant-in-Aid for Scientific Researches from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology; contract grant number: 20592454

magnetron sputtering followed by annealing in air at 873 K,⁹ etc.

On the other hand, carbon-containing materials have recently attracted much attention because of their good biological response. Thus, amorphous carbon has been proposed for use in blood contacting medical devices because of its good blood compatibility.¹⁰ Amorphous carbon nitrate and amorphous carbon films were not only non-toxic to osteoblasts^{11,12} but also exhibited good cellular adhesion, proliferation, and mineralization in an *in vitro* study.¹² Moreover, reduction of osteoclasts by amorphous hydrogenated carbon films has been reported¹³; and amorphous carbon deposited on polyethylene terephthalate repelled bacteria and consequently reduces the infection risk.¹⁴ Interestingly, calcium carbonate scaffold were biocompatible for osteoblasts,¹⁵ with osteoconductive and biodegradable properties.^{15,16}

For that reason, to maximize the advantages of both materials, we developed a modified thermal decomposition method to obtain "calcium titanate-amorphous carbon" ($\text{CaTiO}_3\text{-aC}$),⁵ and a novel alkoxide method to obtain "calcium titanate with calcium carbonate" ($\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$). Alkoxide method showed advantages such as simple, economic, and reproducible technique not requiring any sophisticated technology, getting large mass of material with presence of calcium carbonate. The objective of this work was to compare the crystallinity and elemental composition of different CaTiO_3 preparations, and the effect of these materials on the bone marrow stromal cell (KUSA/A1 cell line) response using HA as positive control. An additional aim was to determine which material plays a more dominant effect in cell proliferation, osteoblastic differentiation, and mineralization.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the materials

$\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ prepared by alkoxide method

Calcium nitrate (SIGMA) was dissolved in 2-Isopropanol (SIGMA) followed by the addition of titanium isopropoxide (Wako, Osaka, Japan). The solution was placed in a draft at room temperature for 1 week until it changed into a consistency of a paste. To transform the paste into powder, it was subjected to a drying procedure by heating at 110°C over night and then at 650°C for 2 h.

$\text{CaTiO}_3\text{-aC}$ and HA prepared by modified thermal decomposition method

The protocol done for modified thermal decomposition was previously described.⁵ For the $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$ particles,

pure calcium carbonate powder (Wako, Osaka, Japan) was decomposed at 1050°C for 2 h to yield CaO. CaO powder was added into previously heated 2-ethylhexanoic acid (Wako, Osaka, Japan) at 120°C until all CaO powder was dissolved. After cooling the 2-ethylhexanoic acid calcium solution, it was added to 1-butanol (Wako, Osaka, Japan), followed by titanium tetraisopropoxide (Wako, Osaka, Japan), and mixed altogether to form a transparent solution. The resultant solution was then dried at room temperature for 1 week, heated at 110°C over night and then at 650°C for 2 h to have powder form.

For the HA particles, 2-ethylhexanoic acid calcium solution was prepared following the modified thermal decomposition method explained earlier. This solution was mixed with 1-butanol, followed by the addition of bis(2-ethylhexyl) hydrogenphosphate (Wako, Osaka, Japan) and distilled water, and then it was stirred to form a transparent solution. The solution was subjected to the same drying procedure mentioned earlier to transform it into powder.

Material characterization

The crystallinity of the samples was characterized by powder X-ray diffraction (XRD, Rigaku RINT2100/PC) with monochromated $\text{CuK}\alpha$ radiation. The elemental composition was analyzed by SEM-EDS (Scanning Electron Microscope, Topcon DS-720, Topcon, Tokyo, Japan-Energy Disperse X-ray Spectrometer, Noran Voyager III M3100, Noran Instruments, Middleton, Wisconsin). To evaluate the evidence of CaCO_3 , FT-IR (Fourier Transforms Infrared Spectrometer, JASCO FT/IR-350) was performed for all CaTiO_3 samples.

Cell culture method

KUSA/A1 cells (courtesy of Dr. A. Umezawa from Keio University, Tokyo, Japan) were cultured in α -MEM (GIBCO, BRL) supplemented with 10% FBS (SIGMA) and 1% antibiotic-antimycotic agent (GIBCO, BRL). KUSA/A1 cells were cultured with the various particles (10 mg/20 mL of medium) or in the absence of the material in 24-multiwell plates (Falcon) for comparing cell proliferation and differentiation properties, or in 3 cm Petri dishes (Falcon) for mineral detection at a density of 7500 cells/cm².

Cell viability assay

Cell viability was measured as mitochondrial NADH/NADPH-dependent dehydrogenase activity, resulting to cellular conversion of tetrazolium salt MTS into a soluble formazan dye^{17,18} with the CellTiter 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay (Promega). KUSA/A1 cells were cultured with or without particles. After an indicated time course, the culture medium was discarded by careful aspiration, and then the cells were incubated in 100 μL of MTS solution and 500 μL of medium for 1 h in a 5% CO_2 gas atmosphere at 37°C. At the end of the incubation, 120 μL of the culture supernatant was transferred to 96-well plate to measure the absorbance at 492 nm.

The absorbance of the MTS reagent incubated without cells was used as the blank value.

Evaluation of alkaline phosphatase activity

The measurement of alkaline phosphatase activity was performed by *p*-Nitrophenyl Phosphate Substrate method (Wako, Osaka, Japan), according to the manufacturer's instruction. This assay was normalized to the total protein (Protein assay from BIO-RAD, Hercules, CA) of the samples. Cell cultures were examined at 0, 4, 7, and 10 days.

Mineralization assay by alizarin red staining

Cells were washed once with phosphate buffered saline (PBS) provided from TAKARA BIO (Japan) and fixed with 95% ethanol at 37°C for 15 min. The fixed cells were washed with distilled water and subsequently stained with 1% alizarin red S (Kayayama chemical, Japan) solution for 5 min. The remaining dye was washed out 3 times with distilled water. The stained samples were visualized by phase microscopy using an inverted microscope.

Mineral quantification

The protocol for the extraction of Alizarin Red staining was adapted from Gregory et al.¹⁹ and Silva et al.²⁰ Five hundred μL of 10% acetic acid (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) was added to each stained samples and incubated for 30 min at room temperature with mild shaking. The monolayer of cells was scraped-off from the plates, transferred to 1.5 mL tubes and vortexed for 30 s. The slurry was covered with 300 μL of mineral oil to prevent evaporation and heated at 80°C for 10 min. Then the samples were centrifuged for 15 min at 14,000 rpm. Three hundred microliter of the supernatant was transferred to 1.5 mL tube and mixed with 100 μL of 10% (v/v) solution of ammonium hydroxide (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan). Aliquots (150 μL) of the supernatant were read in triplicate at 405 nm in 96-well plate.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error. Differences between experimental results were analyzed using Mann-Whitney test, with $p < 0.05$ considered as statistically significant.

RESULTS

Material characterization

XRD analysis was performed to elucidate the crystallinity of the particles. The XRD pattern of all powdered CaTiO_3 showed peaks corresponding to perovskite-type CaTiO_3 peaks (Fig. 1). However, the

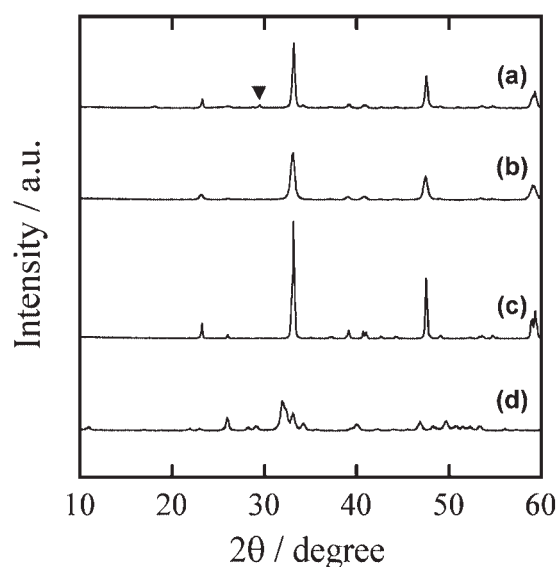


Figure 1. X-ray diffraction patterns of (a) $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$, (b) $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$, (c) CaTiO_3 , and (d) HA particles. ▼ represents CaCO_3 .

commercially-prepared CaTiO_3 showed increased crystallinity with sharper peaks. The mean XRD peaks corresponding to HA were observed in HA group (Fig. 1).

Elemental composition

The elemental composition in all CaTiO_3 measured by SEM-EDS is shown in Figure 2. $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ and $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$ particles showed evidence of C, O, Ca, and Ti. On the contrary, the commercially-prepared CaTiO_3 particles contained O, Ca, and Ti with absence of C.

To elucidate the evidence of CaCO_3 , FT-IR was performed for all CaTiO_3 particles (Fig. 3). $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ showed high amount of calcium carbonate, while $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$ demonstrated low amount of calcium carbonate. In contrast, the commercially-prepared CaTiO_3 revealed absence of calcium carbonate.

Cell viability assay

To examine the viability of bone marrow cells in contact with the particles of all different groups, we carried out a measurement of MTS activity on KUSA/A1 cells after 1, 4, 7, and 10 days in culture (Fig. 4). Results indicated that cell viability increased in all groups after 4 days. Interestingly, cells cultured with $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ demonstrated a significant increase in cell proliferation compared to CaTiO_3 at 4 days ($p = 0.0209$), 7 days ($p = 0.0209$), and 10 days ($p < 0.05$). Moreover, KUSA/A1 cell

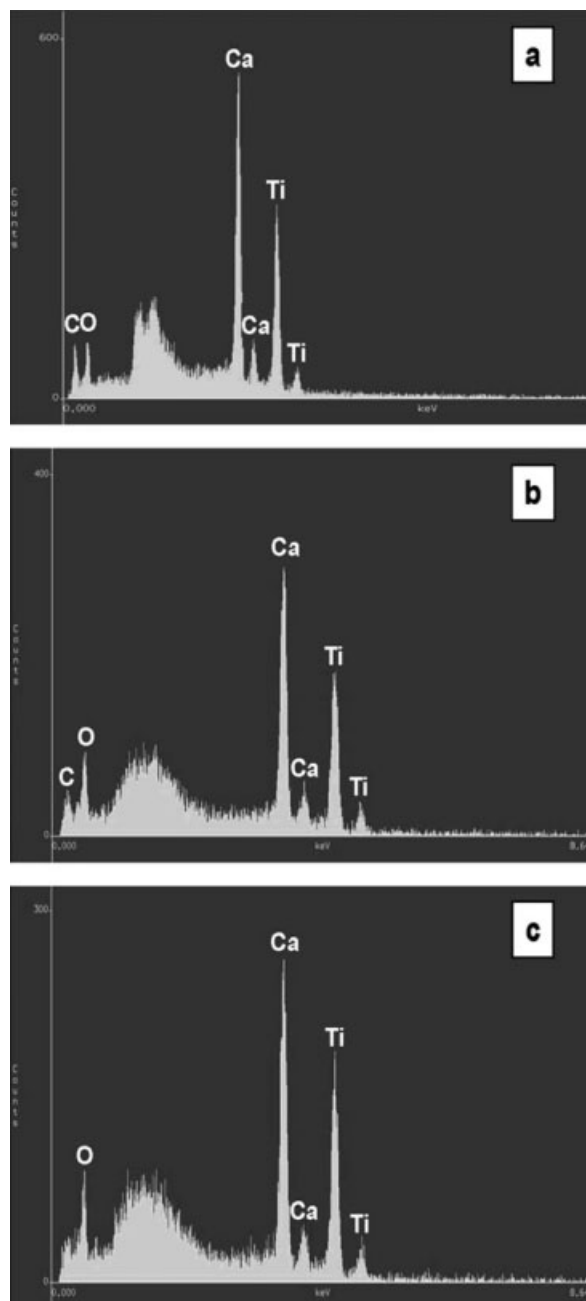


Figure 2. SEM-EDS analysis of (a) $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$, (b) $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$, and (c) CaTiO_3 particles.

viability showed a higher increase than the positive group at 10 days ($p < 0.05$).

Alkaline phosphatase activity

Osteoblastic differentiation was analyzed using ALP activity. Figure 5 summarizes the ALP activities of KUSA/A1 cells on different particles cultured during 0, 4, 7, and 10 days. It reached a maximum expression on day 7 and then decreased on day 10 in all samples. $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ samples demonstrated a

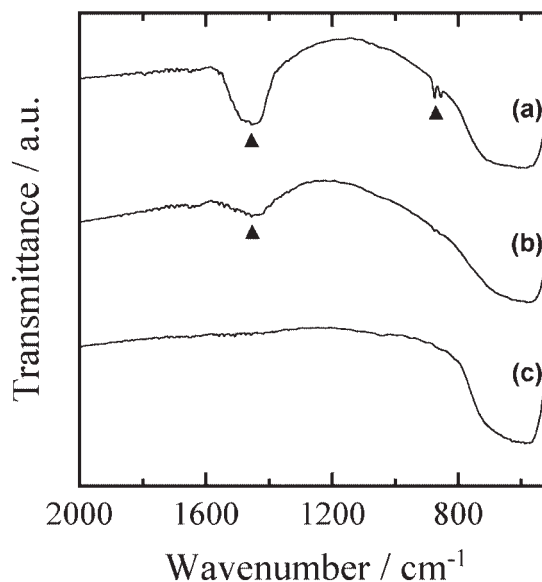


Figure 3. Evidence of CaCO_3 in (a) $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$, (b) $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$, and (c) CaTiO_3 particles detected by FT-IR analysis. ▲ denotes CO_3^{2-} bands in CaCO_3 .

significant increase of ALP activity levels at 10 days compared to $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$, CaTiO_3 , and HA ($p < 0.05$).

Detection and quantification of mineralization

To examine the mineralization potential of KUSA/A1 cells on $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$, $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$, CaTiO_3 , and HA, we stained the cultures with Alizarin red. Figure 6 shows that $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ and $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$ particles were capable of inducing mineralized matrix around the particles similar to the positive control at 4, 7, and 10 days. In contrast, CaTiO_3 showed scanty calcified areas at 10 days, and KUSA/A1 cells alone did not reveal any sign of mineralization.

The quantitative analysis of deposited calcium demonstrated that the result of $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ was similar to the positive control (Fig. 7). Statistical analysis revealed significant differences in $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ compared to KUSA/A1 cells, $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$, and CaTiO_3 at 4, 7, and 10 days ($p < 0.05$).

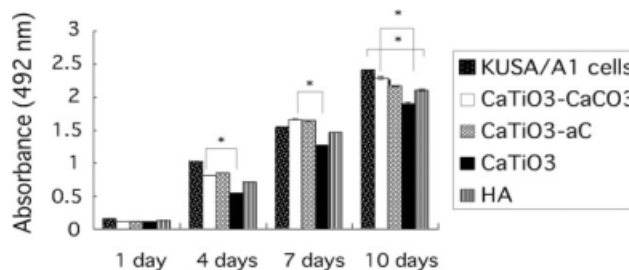


Figure 4. MTS activity of KUSA/A1 cells cultured in the presence or absence of the various particles for 1, 4, 7, and 10 days. Data represents mean \pm SE, $n = 4$.

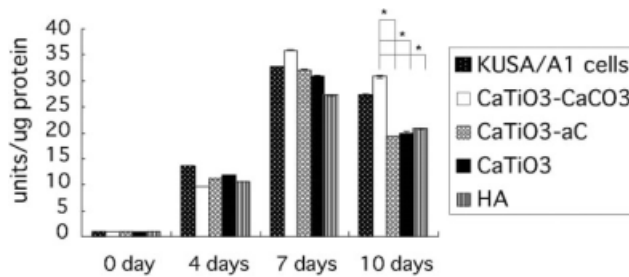


Figure 5. ALP activity of KUSA/A1 cells cultured onto the various particles or in the absence of the material for 0, 4, 7, and 10 days. Data represents mean \pm SE, $n = 4$.

DISCUSSION

Calcium titanate may be prepared by different methods using diverse chemical substances, such as

$\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ prepared with calcium nitrate tetrahydrate, titanium tetraisopropoxide, and 2-Isopropanol; $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$ made with calcium carbonate, 2-ethylhexanoic and titanium tetraisopropoxide⁵; and the commercial CaTiO_3 elaborated with calcium carbonate and titanium oxide.²¹ All of them showed the same perovskite-type CaTiO_3 structure observed by XRD (Fig. 1), but with or without evidence of carbon (Fig. 2) and calcium carbonate (Fig. 3). Interestingly, carbon-containing materials demonstrated good biological response.^{11,12,15,16} Our results exhibited evidence of calcium carbonate in $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ and $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$ with good osteoblast response. In contrast, the commercial CaTiO_3 revealed absence of carbon (Fig. 2) and calcium carbonate (Fig. 3) with poor cell response. Because of this, we believe that the presence of calcium carbonate could play a crucial role in bone induction by calcium titanate material.

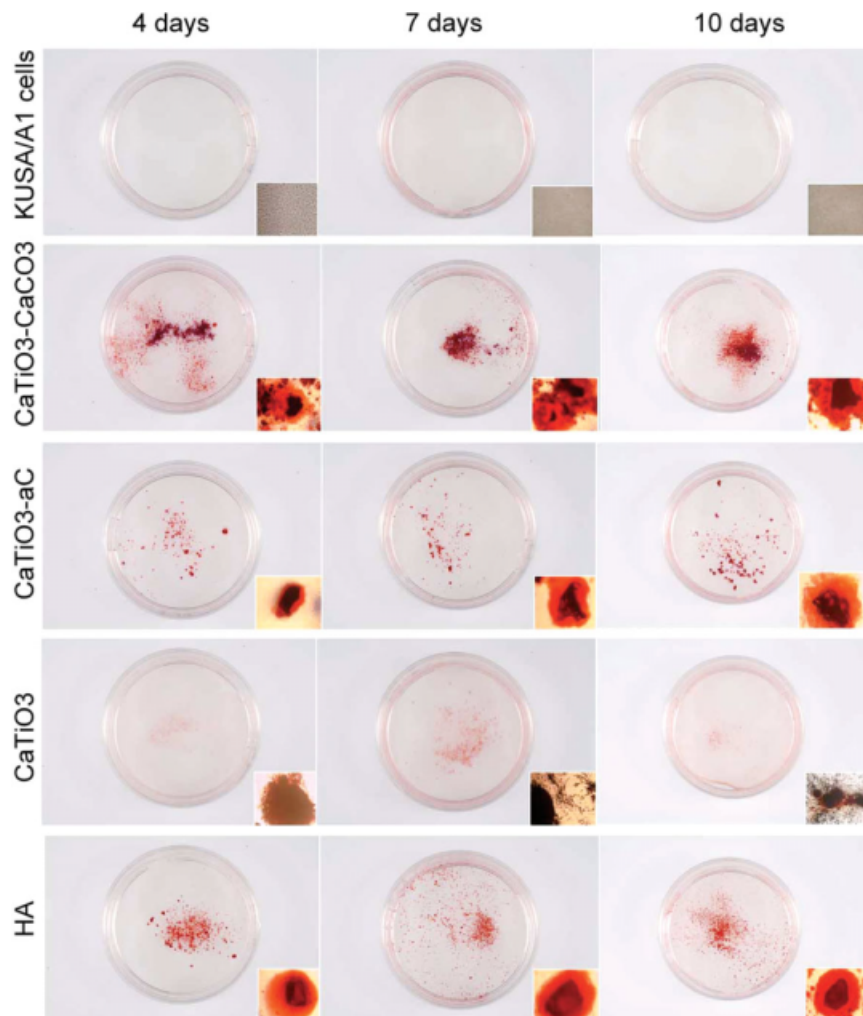


Figure 6. Alizarin red staining for KUSA/A1 cells alone, or cultured onto $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$, $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$, CaTiO_3 , and HA particles, evidencing the higher mineralization level for both $\text{CaTiO}_3\text{-aC}$ and HA compared with the commercial CaTiO_3 clearly observed at high magnification. Note that KUSA cell alone did not reveal any sign of mineralization. Original micromagnification 20 \times . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

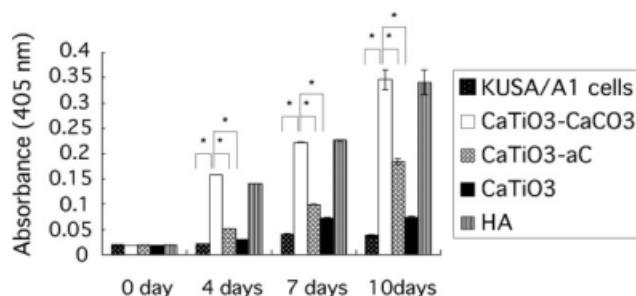


Figure 7. Alizarin red dye quantification for KUSA/A1 cells alone, and cultured onto CaTiO₃-CaCO₃, CaTiO₃-aC, CaTiO₃, and HA particles. After staining, the dye was extracted and quantified in a spectrophotometer. Data represents mean \pm SE, $n = 3$.

To investigate the potential use of CaTiO₃-CaCO₃ as a biomedical and dental material, we studied its influence on cell proliferation, osteoblastic differentiation, and mineralization on *in vitro*. In this study, we used bone marrow stromal cell line (KUSA/A1 cells),²² which is capable of maintaining an immature stage with high cell proliferation in alpha medium and shows good ability for osteogenesis/mineralization only in osteogenic medium.²³ To maintain KUSA/A1 cells in an immature stage for evaluation of cell proliferation induced by different preparation of CaTiO₃, the cells were cultured in alpha medium together with the particles (Fig. 4). Our results demonstrated that CaTiO₃-CaCO₃ induced more cell proliferation compared to the others. In contrast, the commercial CaTiO₃ showed less cell number than the other groups. Similar cell growth was observed between CaTiO₃-aC and HA.

Facilitated ALP expression on calcium titanate particles was confirmed in this study by measuring the enzyme activity. The period showing the maximum activity depends on the condition of culture, such as the type of media, type and concentration of the enhancing material for calcification, and the cell concentration in the initial cultivation.²⁴ Thus, the maximum ALP activity increased on day 7 by CaTiO₃-CaCO₃ indicating its beneficial effect for osteoblastic differentiation (Fig. 5).

Alizarin red S is widely used in the study of tissue structure associated with calcium due to its selective calcium binding ability.²⁵ Because two moles of calcium ions quantitatively bind to a mole of Alizarin red S reagent,²⁶ this staining method is useful in the identification of *in vitro* calcification with a high sensitivity. Previously, we have reported that KUSA/A1 cells are not capable of producing mineralized nodules cultured in alpha medium.²³ Our observations demonstrated that CaTiO₃-CaCO₃, CaTiO₃-aC, and HA induced calcification by KUSA/A1 cells cultured in alpha medium (Fig. 6). On the

contrary, the commercial CaTiO₃ was able to induce scanty mineralization (Fig. 6). The mineral quantification of stained areas increased gradually in all particle groups during the time course, and it was higher in CaTiO₃-CaCO₃ after 10 days (Fig. 7). Therefore, it is reasonable to suggest that CaTiO₃-CaCO₃ has a good stimulatory effect on KUSA/A1 cells to induce mineralized nodule formation. It is well known that alkaline phosphate activity is increased before the crystallization of the calcium and phosphate ions during bone matrix formation and its activity is decreased once the calcification starts.²⁴ Similar result was seen in the present study, where ALP decreased with a maximum mineralization at 10 days in all samples.

In summary, it has been reported that the commercial reagent of CaTiO₃ has good bone biocompatibility.^{21,27} Interestingly, our current observations showed that CaTiO₃-CaCO₃ material, which contains high amount of calcium carbonate, has better influence on the bone marrow stromal cells for their proliferation, differentiation, and mineralization compared to the commercially-prepared CaTiO₃ and the positive control HA. These results suggest that the presence of calcium carbonate in the material could play a key role in the cell response of calcium titanate. To our knowledge, this is the first study describing the potential role of calcium carbonate incorporated in CaTiO₃ material giving better cell response. The percentage of calcium carbonate in CaTiO₃-CaCO₃ might need special attention and further experiments are necessary for agreeable clinical results. Nonetheless, there are still other issues left to examine, such as optimum particle size and surface of CaTiO₃-CaCO₃ for getting the best osteoblastic cell response. In conclusion, our findings indicate that CaTiO₃-CaCO₃ plays a more dominant and favorable effects on cell response, which could be considered as an important biomaterial candidate for medical and dental applications.

The authors mention their special thanks to their formal Professor, Dr. Noriyuki Nagai for his excellent mentorship and support in this research project.

References

- Okazaki Y, Rao S, Ito Y, Tateishi T. Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new Ti alloys without Al and V. *Biomaterials* 1998;19:1197-1215.
- Okazaki Y, Gotoh E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. *Biomaterials* 2005;26:11-21.
- Nayab SN, Jones FH, Olsen I. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium. *Biomaterials* 2005;26:4717-4727.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Lanford WA. Increased osteoblast adhesion on titanium-coated hydroxylapatite that forms CaTiO₃. *J Biomed Mater Res A* 2003;67:975-980.

5. Nagai N, Okauchi M, Rodriguez A, Gunduz M, Hailong H, Kubota M, Nagaoka N, Inoue M, Nagatsuka H, Takagi T, Akao M. Development of a new titanium coating material (CaTiO₃-aC) with modified thermal decomposition method. *J Hard Tissue Biol* 2008;17:47-54.
6. Manso M, Langlet M, Martínez-Duart JM. Testing sol-gel CaTiO₃ coatings for biocompatible applications. *Mater Sci Eng C* 2003;23:447-450.
7. Holliday S, Stanishevsky A. Crystallization of CaTiO₃ by sol-gel synthesis and rapid thermal processing. *Surf Coat Technol* 2004;188/189:741-744.
8. Fujishiro Y, Sato N, Uchida S, Sato T. Coating of CaTiO₃ on titanium substrates by hydrothermal reactions using calcium-methylene diamine tetra acetic acid chelate. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:363-367.
9. Ohtsu N, Sato K, Saito K, Hanawa T, Asami K. Evaluation of degradability of CaTiO₃ thin films in simulated body fluids. *Mater Trans* 2004;45:1778-1781.
10. Yang P, Huang N, Leng YX, Chen JY, Fu RK, Kwok SC, Leng Y, Chu PK. Activation of platelets adhered on amorphous hydrogenated carbon (a-C:H) films synthesized by plasma immersion ion implantation-deposition (PIII-D). *Biomaterials* 2003;24:2821-2829.
11. Du C, Su XW, Cui FZ, Zhu XD. Morphological behaviour of osteoblasts on diamond-like carbon coating and amorphous C-N film in organ culture. *Biomaterials* 1998;19:651-658.
12. Rodil SE, Olivares R, Arzate H. In vitro cytotoxicity of amorphous carbon films. *Biomed Mater Eng* 2005;15:101-112.
13. Schroeder A, Francz G, Bruinink A, Hauert R, Mayer J, Wintermantel E. Titanium containing amorphous hydrogenated carbon films (a-C: H/Ti): Surface analysis and evaluation of cellular reactions using bone marrow cell cultures in vitro. *Biomaterials* 2000;21:449-456.
14. Wang J, Huang N, Yang P, Leng YX, Sun H, Liu ZY, Chu PK. The effects of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion. *Biomaterials* 2004;25:3163-3170.
15. Doherty MJ, Schlag G, Schwarz N, Mollan RA, Nolan PC, Wilson DJ. Biocompatibility of xenogeneic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblasts. *Biomaterials* 1994;15:601-608.
16. Dermers C, Hamdy CR, Corsi K, Chellat F, Tabrizian M, Yahia L. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review. *Biomed Mater Eng* 2002;12:15-35.
17. Relic B, Guicheux J, Mezin F, Lubberts E, Togninalli D, Garcia I, van den Berg B, Guerne PA. IL-4 and IL-13, but not IL-10, protect human synoviocytes from apoptosis. *J Immunol* 2001;166:2775-2782.
18. Magne D, Bluteau G, Fauchoux C, Palmer G, Vigned-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: Possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 2003;18:1430-1442.
19. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004;329:77-84.
20. Silva GA, Coutinho OP, Ducheyne P, Shapito IM, Reis RL. The effect of starch and starch-bioactive glass composite microparticles on the adhesion and expression of the osteoblastic phenotype of a bone cell line. *Biomaterials* 2007;28:326-334.
21. Ukegawa Y. Pull-out strength and bone tissue reaction of plasma-sprayed hydroxyapatite coating with different thicknesses or substrates. *J Jpn Orthop Assoc* 1992;60:688-702.
22. Umezawa A, Maruyama T, Segawa K, Shaddock RK, Waheed A. Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J Cell Physiol* 1992;151:197-205.
23. Rodriguez AP, Tsujigiwa H, Borkosky S, Missana L, Sfer AM, Gulsan SA, Gunduz E, Lefevre MB, Takagi T, Nagai N. Biological analysis of a candidate stem cell -KUSA/A1 cell- for bone tissue engineering. *J Hard Tissue Biol* 2007;16:1-14.
24. Lee YK, Song J, Lee SB, Kim KM, Choi SH, Kim CK, LeGeros RZ, Kim KN. Proliferation, differentiation, and calcification of preosteoblast-like MC3T3-E1 cells cultured onto noncrystalline calcium phosphate glass. *J Biomed Mater Res A* 2004;69:188-195.
25. McGee-Russell SM. Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem* 1958;6:22-42.
26. Nakamura T, Yamamuro T, Higashi S, Kokubo T, Ito S. A new glass-ceramic for bone replacement: Evaluation of its bonding to bone tissue. *J Biomed Mater Res A* 1985;19:685-698.
27. Ohtsu N, Sato K, Yanagawa A, Saito K, Imai Y, Kohgo T, Yokoyama A, Asami K, Hanawa T. CaTiO₃ coating on titanium for biomaterial application-Optimum thickness and tissue response. *J Biomed Mater Res A* 2007;82:304-315.

Original

Antibacterial Activity and Biocompatibility of Zinc Oxide and Graphite Particles as Endodontic Materials

Silvia Noemi Kozusko^{1,2)*}, María Alejandra Sánchez^{1)*}, María Inés Gutiérrez de Ferro³⁾, Ana María Sfer⁴⁾, Ana Paula Moreno Madrid¹⁾, Kiyofumi Takabatake⁵⁾, Keisuke Nakano⁵⁾, Hitoshi Nagatsuka⁵⁾ and Andrea Paola Rodríguez¹⁾

¹⁾ Laboratorio de Medios e Interfases (LAMEIN), Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnologías (FACET), Universidad Nacional de Tucumán, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

²⁾ Cátedra de Anatomía y fisiología Patológicas de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina

³⁾ Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina

⁴⁾ Departamento de Estadística, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina

⁵⁾ Department of Oral Pathology and Medicine Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, Japan

(Accepted for publication, July 19, 2017)

Abstract: The aim of this work is to evaluate the antibacterial effect and biocompatibility of zinc oxide (ZnO) nanoparticles and graphite-type carbon (Gt) microparticles commercial powders. SEM analysis was performed to assess particles morphology. The antibacterial behavior was studied against *Staphylococcus aureus* (Staph. Aureus) (bacterial strain ATCC 29213) and TEM analysis of bacteria was performed to determine ultrastructural alterations; in addition, biocompatibility was evaluated in subcutaneous tissue of Wistar rats at 3, 7 and 28 d. ZnO and Gt powders exhibited antibacterial activity while TEM images of Staph. aureus showed membrane disruption followed by the release of internal content. Also, an electron-light region within the cytoplasm was observed for microorganisms treated with ZnO. Regarding biocompatibility, Gt samples induced a foreign body reaction response with presence of giant cells whereas ZnO samples showed fibroblastic connective tissue with chronic inflammatory cells and new small vessels. Also, collagen fibers and lack of capsule was observed by Trichome Masson stain. Thus, ZnO improved wound healing by enhancing tissue regeneration in contrast with calcium hydroxide control sample response which showed a fibrous tissue scar. Hence, ZnO nano-powder seems to be a potential material in the regenerative endodontic field.

Key words: Antibacterial Agents, Zinc Oxide, Graphite, *Staphylococcus aureus*, Foreign body reaction

Introduction

Root canal therapy is one of the most common procedures within endodontics. Here, the inflamed or infected pulp is removed and the inside of the tooth is carefully cleaned and disinfected, to subsequently be filled and sealed with different materials. Effective endodontic treatment with consequent healing depends mainly on thorough chemo-mechanical cleaning and shaping of the root canal therapy¹⁾. Removal of bacteria from the root canal system is necessary for successful root canal therapy²⁾. However, it is impossible to access completely to the accessory canals and lateral ducts considering their sizes and irregularities in shape. Therefore, materials used in this stage should be capable to penetrate into all small canals, to have antimicrobial effects, to present high biocompatibility, low toxicity and to be promoters of bone formation³⁾. Due to these limitations, new sealers, irrigation solutions and intracanal dressing have been developed to improve and complement the mechanical debridement procedure. In this matter, biocompatible and antimicrobial properties turn out to be the main important features for improving endodontic treatment.

Introduction of nanosize based materials has brought new abilities

into different scientific fields. In this regard, it has been documented the use of nanoparticles in disinfecting root canal space. Some studies have investigated chitosan and ZnO nanoparticles in endodontic disinfection and have obtained positive results^{4,5)}. It is known, that ZnO nanoparticles have selective toxicity to bacteria but exhibit minimal effects on human cells⁶⁾. Moreover, it has been reported that the size and surface of carbon-based nanomaterial (nanoparticles, fullerenes, single-walled carbon nanotubes, graphene oxide) play a significant role in the antibacterial activity⁷⁻¹⁰⁾. Graphite has been evaluated as a biomedical material in heart valves, biosensors and joints¹¹⁾. In combination with poly (vinyl alcohol) hydrogel it was also studied for fixation of artificial cornea¹²⁾. Hence, we believe that graphite composites could represent a suitable candidate as an endodontic biomaterial.

It is known that antibacterial activity of nanomaterials is inversely proportional to the size of the nanoparticles involved¹³⁾. ZnO has shown to have the same mechanism in the antibacterial activity as well as in human cell toxicity¹⁴⁾. Hence, a very small particle could have the best antibacterial effect and, at the same time, could be more related to enhanced host tissue damage. For this, particle size is crucial for endodontic applications.

Until now, several methods have been used to evaluate the biocompatibility of endodontic materials. One of the most practical and widely used methods is the implantation of the material into the subcutaneous connective tissue of rats. The local effect of the materials

* Equal contribution.

Correspondence to: Dr. Andrea Rodríguez, Laboratorio de Medios e Interfases (LAMEIN), Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnologías (FACET), Universidad Nacional de Tucumán, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina; Tel: +543814364120; E-mail: aprodiguez@herreria.unt.edu.ar

can be evaluated by the histopathological examination of tissue response around the implant¹⁵. In this research, calcium hydroxide (Ca(OH)₂) is used as the positive control regarding its antimicrobial effect, biocompatibility, physical properties, solubility and periapical healing effect¹⁶.

Regarding endodontic materials, there is currently no commercially available material that joins all needed properties for a successful endodontic treatment. Because of this, the main goal of this work is to evaluate the antibacterial effect and biocompatibility of ZnO and graphite-type carbon (Gt) powders. All of them were compared with the well-known response of Ca(OH)₂. For antibacterial assay, Gram-positive *Staphylococcus aureus* was selected because it is one of the most frequently isolated species in primary endodontic infections

Materials and Methods

Powder materials used in this work were the following: pure zinc oxide (ZnO, Sigma-Aldrich, Argentina), graphite (Sigma-Aldrich, Argentina) and calcium hydroxide (Ca(OH)₂, Farmadental, Argentina). In all cases biological evaluation was performed according to international standards. For antibacterial assay, *Staph. aureus* bacterial strain ATCC 29213 was used; and for biocompatibility assay, all samples were implanted in subcutaneous tissue of Wistar rats. All animal experiments were approved by Universidad Nacional de Tucumán Animal Care and Use Committee.

Scanning Electron Microscopy

The morphology of ZnO and Gt particles was characterized by scanning electron microscopy (SEM Zeiss Supra 55VP, Germany) operating at a high voltage of 15 kV. The samples were sputter coated with gold before SEM imaging. Micrographs were taken at low and high magnification to have a detailed overview of the particle morphology.

Microbiological Assay

The experimental procedure was performed in accordance with ISO-22196. Before running antibacterial sensitivity assay, fresh culture medium, agar plates, PBS, distilled water and Poly methyl-methacrylate (PMMA) discs were prepared and sterilized.

To prepare Luria-Bertani (LB) broth, 10 g/l of sodium chloride, 5 g/l of yeast extract and 10 g/l of tryptone/peptone from casein were weighted and placed into a precipitation glass. Then distilled water was poured and the system was magnetically stirred up until dissolution. The broth was then autoclaved at 121°C for 20 min and subsequently stored at 2-8°C for no more than 1 month. To prepare LB agar plates, 14 g/l of agar-agar was weighted and added with the other ingredients to solidify the LB growth medium. Once the agar medium was dissolved and sterilized, the liquid was quickly poured onto petri dishes. Agar solidifies below 60°C, reason why this step was performed while the agar was still warm. Subsequently petri dishes were cooled down at room temperature and then stored at 2-8°C upside down to avoid condensed droplets to fall on the sterile gel. Phosphate buffer saline (PBS) was prepared by mixing 8 g/l of sodium chloride, 0.2 g/l of potassium chloride, 1.15 g/l of di-sodium hydrogen phosphate anhydrous and 0.2 g/l of potassium di-hydrogen phosphate anhydrous. All these salts were weighted and dissolved in distilled water.

Staph. aureus was inoculated in LB broth at 37°C for 18 h. PMMA was used to prepare 5 mm diameter disks which were used as substrates for testing each material. A measure of 1 mg of ZnO, Gt and Ca(OH)₂ was individually spread on top of the disks followed by a 10 µl-drop of bacteria strain with a concentration of 10⁹ CFU/ml. Also, a bare

PMMA disk and one containing amoxicillin were used as controls in this experiment. After 2 h of incubation, bacteria were recovered from each disk by immersing each sample in 1 ml of PBS in Falcon tubes and thoroughly vortexed for 1 minute. Then, 100 µl were pipetted from each tube and further dissolved in 900 µl of fresh LB broth placed in Eppendorfs tubes. After a short vortexing, 10 µl of each tube were pipetted and dropped on LB agar plates which were subsequently incubated. Colony forming units (CFU) were counted after a 18-hour incubation period at 37°C aerobically and CFU/ml were calculated, results were analyzed statistically using One way Anova followed by Tukey test.

Transmission Electron Microscopy

The collected controls and treated cells were fixed with Karnovsky fixer¹⁷. The samples were washed 3 times with phosphate buffer and then treated with 2% osmium tetra oxide overnight. After eliminating the remaining solution, the samples were washed 3 times with distilled water and immersed in phosphate/acetate buffer for 30 min in darkness. The remaining solution was again discarded, and the dehydration process was conducted with 70, 90 and 100 % of alcohol. The fixed cells were embedded with resin. Ultrathin sections were cut with ultramicrotome; the samples were double stained with uranyl acetate during 3 min and in citrate for 2 min¹⁸ and further observed using a Zeiss EM 109 TEM (Zeiss, Germany).

Biocompatibility examination in vivo

In order to ensure reproducibility, the experimental procedure was performed in accordance with ISO-10993-6. Nasogastric tubes from Silmag® with the following dimensions: external diameter 1.4 mm; internal diameter 0.4 mm and length 5 mm, were used. Fifteen 2-month-old male rats Wistar weighting 200±30 g were randomly selected. All procedure was developed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th edition¹⁹. The animals were anesthetized by intra-peritoneal administration of ketamine hydrochloride (40 mg/kg) and xylazine hydrochloride (20 mg/kg). The dorsal skin was shaved and disinfected with solution of 10% iodine-povidone solution (Phoenix SAIC, BA, Argentina). Two 8 mm long incision per animal were made through the skin with a scalpel along with the vertebral axis. On each incision, two subcutaneous pockets were prepared by blunt dissection at each side of the incision. ZnO and Gt materials were mixed with physiological solution to obtain a paste which would facilitate the tube filling. Each silicon tube was filled with the corresponding powder and then sterilized. An empty tube and a tube containing Ca(OH)₂ were used as controls for all experiments. Each tube was carefully placed into a pocket to a depth of 20 mm from the incision to prevent smearing of the test material on the outer tube areas. After material implantation, the wounds were sutured with ETHILON™ Nylon Suture monofilament blue. All animals received normal diet and water during the entire study period.

Animals were euthanized by anesthesia overdose after 3, 7 and 28 d for tissue response examination. The implants were removed together with the surrounding tissues and immersed in 10% neutral buffered formalin (pH 7.4). After fixing for 24 h, the samples were processed for routine histological evaluation. Paraffin blocks were oriented parallel to long axis of the tubes and longitudinal serial section of approximately 5-µm thick were cut from the middle of the implant and stained with hematoxylin and eosin and Masson's trichrome stain. To evaluate the tissue response, sections of the borders of each tube were analyzed by optical microscopy. The controlled variables were inflammatory reaction, necrosis, fibrosis tissue, calcification and foreign

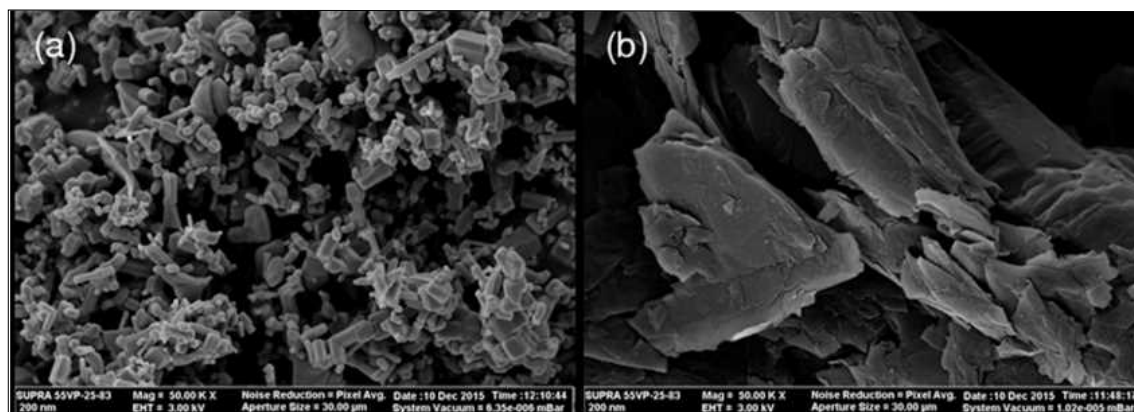


Figure 1. SEM examination of experimental material. (a) ZnO particles with cylindrical shape and 50-400 nm in size, (b) Gt particles in the form of irregular sheets and micrometric sizes.

body cell response. According to ISO 7405:1997 standard, the tissue and inflammatory reactions were graded as follows: 0= None: No inflammatory cells infiltration 1= Mild: Scattered chronic inflammatory cells without tissue changes 2= Moderate: Focal inflammatory cell infiltration with tissue changes but without necrosis 3= Severe: Severe infiltration of inflammatory cells 4= Abscess: Abscess formation^(20,21).

All specimens were digitally photographed under a light microscope, and Image Pro Plus software was used as a toolkit to measure the variables necrosis. For fibrosis tissue, calcification and foreign body cell response scoring 0 were: 0= absent and 1= present. The result was analyzed statistically by Kruskal-Wallis Test.

Results

Scanning Electron Microscopy

Surface topography of ZnO nanoparticles was characterized by scanning electron microscopy. The nanorods were found to be approximately 50 nm in diameter and 400 nm in height (Fig. 1a). The Gt surface topography was also analyzed showing irregular sheets particles with average sizes in the order of microns (Fig. 1b).

Microbiological Assay

Fig. 2 shows the bacteria inhibition of *Staph. aureus* after being in contact with bare PMMA disk, Amoxicillin, ZnO, Gt and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ powders. Cells count was determined as log₁₀ CFU/ml by colonies formed on LB agar plates. In general, reduced inhibition effect was observed for all the powder tested. A 10-times reduction of CFU/ml was observed for ZnO and Gt powder after two h of incubation of bacteria in contact with powders. Significant inhibition in growth was detected between the PMMA control disk and all the other tested materials. As expected, the former bare PMMA disk showed normal bacteria proliferation while the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ negative control disk showed perfect inhibition of *Staph. aureus* growth on all experiments. Moreover, there was no significant difference ($p < 0.05$) in cell number (CFU/ml) determined between ZnO and Gt powder. For this assay amoxicillin, a broad-spectrum antibiotic, was chosen as another control sample.

Transmission Electron Microscopy

TEM experiments were carried out to observe the direct membrane damage and intracellular structure change. The intracellular structure of the untreated *Staph. aureus* cells which were in contact with the bare PMMA disk (Fig. 3a,b). The typical round-shaped cells showed unanimous electron density. The outer membrane layer of the cell envelope and inner protoplasm were clearly visible. Also, the outer

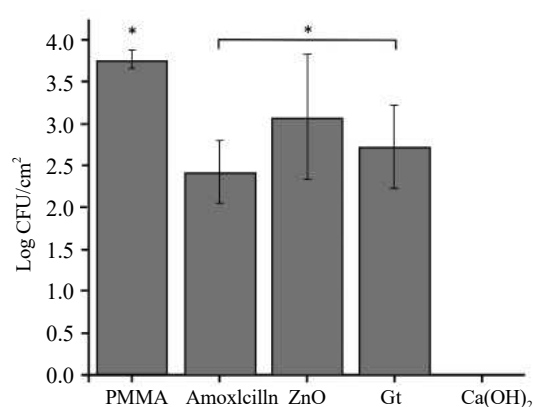


Figure 2. Effect of ZnO and Gt powder on *S. aureus* growth. Cells count was determined as log₁₀ CFU/ml by colonies formed on LB agar plates. Amoxicillin, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and a bare PMMA disk were used as control samples. Mean ± SD are plotted, (*) indicates significant difference in value.

membrane layer showed to be smooth and continuous. When cells were exposed to ZnO powder, significant membrane damage and intracellular structure change could be seen (Fig. 3c,d). Moreover, release of the internal cell material and difference in the internal cytoplasm density could be observed. In general, cells treated with ZnO powder showed that the outer membrane layer was neither intact nor clearly visible. Also, the cytoplasm membrane shrank and detached from the cell wall slightly. This behavior was not evidence neither in the control cells or in cells treated with Gt powder. The latter showed microorganisms with both, a disruptive membrane layer with a corrugated shape (Fig. 3e,f) and normal cells without evident changes.

Histomorphological evaluation

Silicone group

At 3 d, a thin layer of necrotic tissue, scanty neutrophils new vessels, and lymphocytes were observed in direct contact with the material. At 7 d, the inflammation-free fibrous tissue was seen in direct contact with silicone. At 28 d, fibrous capsule appeared to be all over the material.

Calcium hydroxide group

At 3 d of implantation, the necrotic tissue was observed surrounding the material (Fig. 4a). Moreover, polymorphonuclear neutrophils, newly formed vessels and lymphocytes were evident as well. At 7 d, necrotic tissue, polymorphonuclear and the neutrophils were scanty (Fig. 4b).

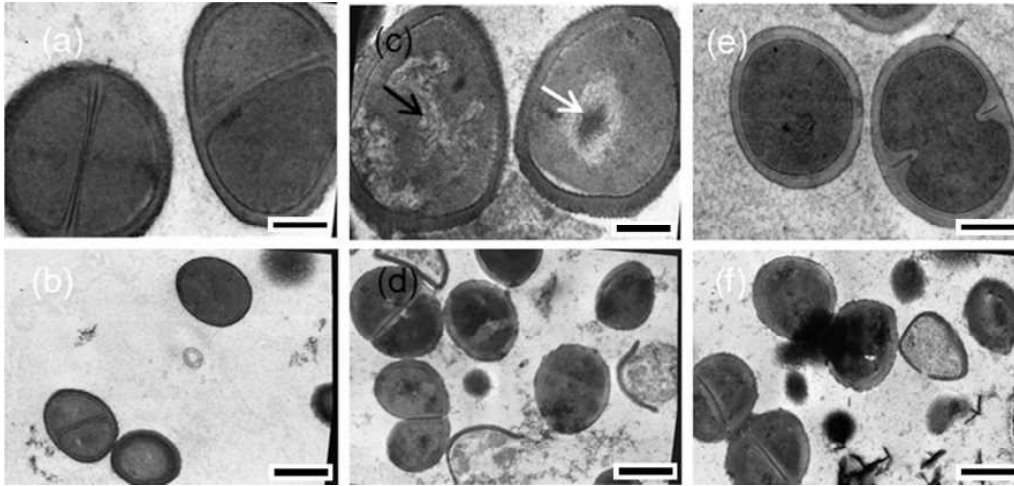


Figure 3. TEM images showing the ultrastructural effect of ZnO and Gt powders on *S. aureus*. Bacteria untreated in contact with PMMA disks (3a-b); in presence of ZnO powder (3c-d); and in presence of Gt powder (3e-f), at 34300X and 22800X, respectively. Ultrastructure damage is seen for ZnO and Gt samples. Microorganisms treated with ZnO showed an electron-light region with a condensed substance in the center (marked with an arrow). Scal bars=200nm

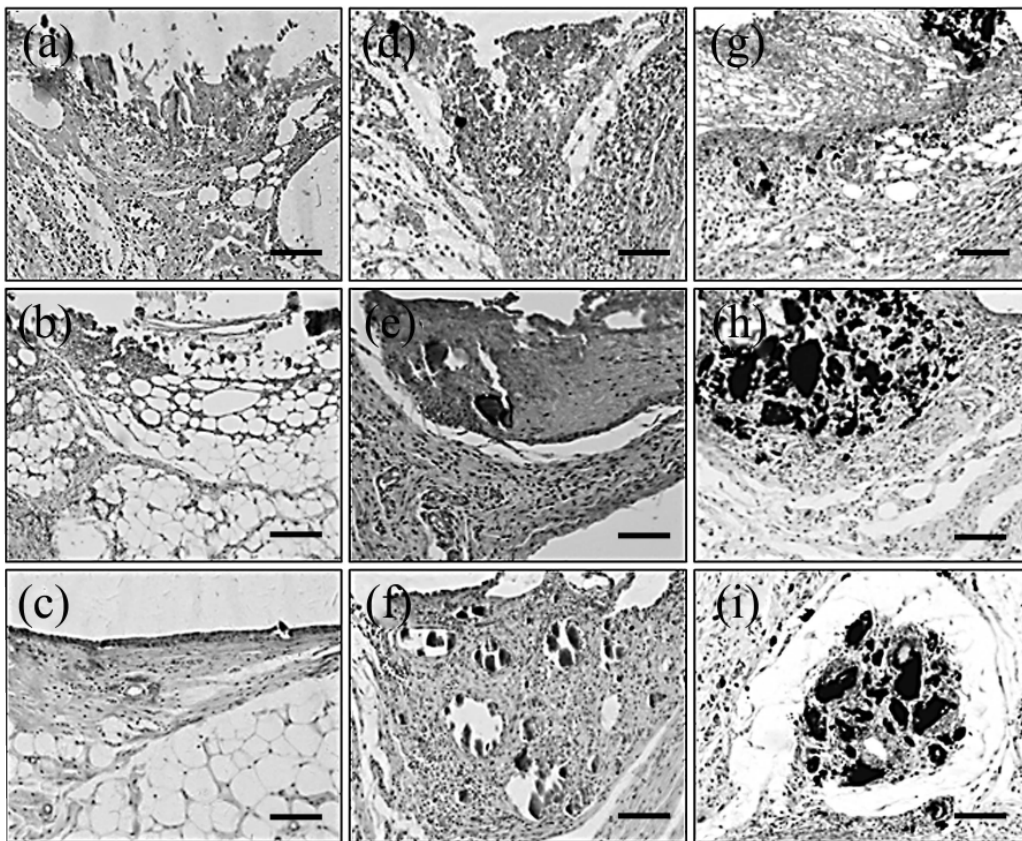


Figure 4. Histological response of Ca(OH)_2 , ZnO and Gt samples. a) Ca(OH)_2 at 3(a), 7 (b) and 28 (c) ds showing an initial necrosis, inflammation response and later healing reparation by fibrotic tissue; ZnO at d 3(d) with necrosis at material contact and infiltration of inflammatory cell, ZnO at the d 7(e) presenting necrotic tissue, inflammatory cells and vessels neoformation, ZnO a d 28 (f), showing particles surrounded by connective fibrous with angiogenesis and inflammatory cells; Gt at d 3(g), showing material displacement from the implanted tubes with scanty necrotic tissue and infiltrated neutrophils, Gt at d 7(h), particles are surrounded with chronic inflammation and macrophages giant cells, Gt at d 28(i), particles are surrounded by giants cells and a thin partial fibrous capsule (H&E). Scal bars=50µm

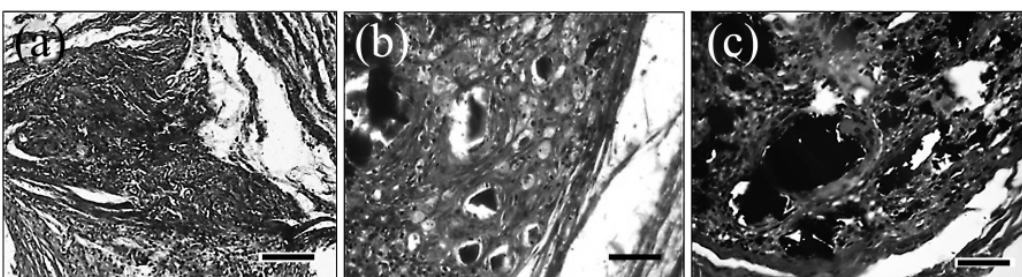


Figure 5. Presence of collagen fibers by Masson stain at 28 ds. (a) Connective fibrous showing fibrous collagenous and little vessels formation for Ca(OH)_2 samples, (b) presence of fibrous collagenous matrix showing the material particles, neovascular formation and inflammatory cells for ZnO samples, (c) material surrounded by giants cells and few collagen fibrous with a thin capsule for Gt samples, Masson. Scal bars=50µm

Table 1. Inflammatory scores attributed to the materials in each rat (R) at different experimental period.

Groups	3d	7d								28d					
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15
Calcium Hydroxide	4	4	4	4	4	3	4	4	4	3	1	1	1	1	1
Silicone	4	4	4	4	4	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
Zinc Oxide	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3
Graphite	4	4	4	4	4	3	4	3	4	4	3	3	3	3	3

(0) None: No inflammatory cells infiltration, (1) Mild: Scattered chronic inflammatory cells without tissue changes, (2) Moderate: Focal inflammatory cell infiltration with tissue changes but without necrosis, (3) Severe infiltration of inflammatory cells, (4) Abscess: Abscess formation

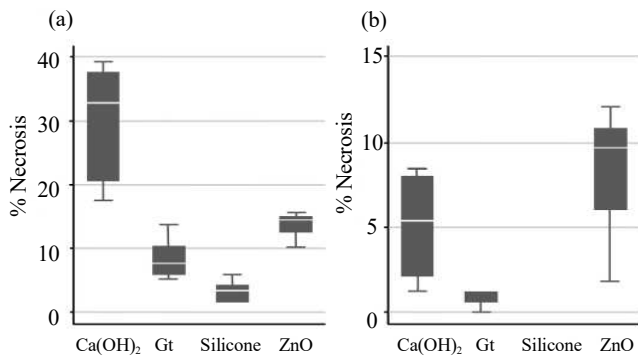


Figure 6. Necrotic tissue percentage for all samples. Statistical study of necrotic tissue at 3 ds(a) and 7 ds (b). Ca(OH)₂ shows the highest percentage of necrotic response for 3 ds. At 7 ds an increased percentage was observed for ZnO nanoparticles over control sample

The granulation tissue was formed with presence of few lymphocytes. At 28 d, fibrous tissue with scanty vessels formation was presented all around the end portion of each tube. Furthermore, three of the five samples presented fibrosis and calcification (Fig. 4c). The Masson's trichrome stain allowed detecting collagen fibers within the tissue (Fig. 5a).

Zinc Oxide Group

At 3 d, the samples showed necrotic tissue around the material. Moreover, inflammatory reaction was also observed (Fig. 4d). At 7 d, enhance necrosis and inflammatory reaction was detected as well as material displacement (Fig. 4e). At 28 d, particles were detected to surround fibroblastic connective tissue together with chronic inflammatory infiltration, new small vessel formation and no fibrous capsule (Fig. 4f). Trichrome Masson stain demonstrated the presence of abundant collagen fibers and no capsule shape was evidenced (Fig. 5b).

Graphite group

At 3 d, Gt samples showed material displacement and necrotic tissue. A moderate inflammatory reaction was observed. The tissue was infiltrated with neutrophils and few macrophages. The new small vessels were also observed (Fig. 4g). At 7 d, the material was also released from the implanted tubes. A chronic inflammation and the presence of macrophages containing the tested materials were revealed. Moreover, giant cells were found surrounding particles material, scanty vessels were evidence without formation of fibrous tissue (Fig. 4h). At 28 d, giant cells were seen to be in direct contact with material released from the tubes. Also, it was observed macrophages phagocytosing graphite particles with a partial and thin fibrous capsule (Fig. 4i). Also, scanty collagen fibers and a marked capsule formation were observed by the Trichrome Masson stain (Fig. 5c).

The Inflammatory reactions scores attributed to the materials in each experimental period (Table 1) and the statistical analysis determined

that samples were significantly different at 7 and 28 d with $p=0.0027$ y $p=0.0003$, respectively.

Histomorphometrical evaluation

At 3 d, necrotic tissue was revealed in a great percentage of the study area, being the highest percentage in Ca(OH)₂ samples followed by ZnO, Gt and the lowest percentage corresponded to silicone sample, being significantly different, $p<0.001$, (Fig. 6a). At 7 d, necrosis had the highest percentages in the treated parts from ZnO, followed by Ca(OH)₂ and then Gt, being all of them statistically different, $p = 0.0034$, (Fig. 6b). At 28 d, necrosis was absent.

Discussion

Root canal therapy represents a standard treatment that involves removing dental pulp, control considering it is the gold standard for biocompatibility and antibacterial endodontic tests^{22,23} decontaminating residually infected tissue through biomechanical instrumentation and root canal obturation using a filler material to replace the space that was previously composed of dental pulp. Gutta-percha is typically used as a filler material as it is malleable, inert and biocompatible. However, traditional gutta-percha has certain shortcomings including leakage, root canal reinfection, and poor mechanical properties⁷. Therefore, new fillers and composites are widely being studied to overcome these issues. As an initial evaluation of a new endodontic materials, we designed this study to assess antimicrobial performance of ZnO and Gt compared with Ca(OH)₂, where the latest was chosen as the positive

Various bacterial strains can be encountered during reinfection scenarios following root canal therapy. Therefore, gram-positive Staph. aureus strain was selected as the model bacterium, as it has been previously observed in endodontic failure cases^{24,25}. Different antimicrobial susceptibility testing methods are known and most of them are done in aqueous media or cell culture media and the antibiotic needs to be in a liquid form²⁶. When testing powders, the main problem is to have a homogeneous sample. As the addition of any surfactant substance would be controversial for the experiment, we adapted the international ISO-22196 standard to test commercial ZnO, Gt and Ca(OH)₂ powders against Staph. aureus. Moreover, this method shows the advantage of simulating clinical conditions where materials will be placed in aqueous medium. In this matter, the presence of powder micro-sizes agglomerations would reproduce clinical conditions.

ZnO is an environmental-friendly material which has been used in medical applications such as cancer treatments and DNA detection^{27,28}, and nowadays is widely being studied for dental applications^{29,30}. In endodontic treatment, it is well known that particle size plays a key role on root canal disinfection. In the nano-scale, ZnO have shown bactericidal effect on numerous Gram-positive and Gram-negative bacterial strains^{31,32}. Proposed mechanism for its antibacterial activity include the induction of H₂O₂, a strong antioxidizing agent^{33,34}, disruption of cell membrane and leakage of its cytoplasm contents³¹ as well as internalization of nanoparticles³⁵. Moreover, ZnO

nanoparticles have selective toxicity to bacteria exhibiting minimal effect on human cells³⁶). It is known that ZnO is nearly insoluble in water, it agglomerates immediately in contact with water due to the high polarity, so micro-sizes aggregation can be present and hence, ZnO properties may change³⁶). For this, we selected ZnO nanoparticles as the base of an endodontic material in the present work.

Graphite represents one of the main allotropic forms of carbon along with diamond. It is comprised exclusively by carbon atoms organized as infinitive layers called graphene sheets. Carbon nanomaterials such as fullerenes, carbon nanotubes or graphene, other carbon allotropic forms, have been widely studied regarding their toxicity towards bacteria and human cells³⁷⁻³⁹). Carbon nano-sized, were used to enhance the performances of implants, as tissue engineering scaffolds^{40,41}) and as composites on human dental follicle stem cells⁴²). However, in general, their biological applications depend on the synthesis method and functionalization⁴²). In contrast, few toxicity studies of graphite were performed. Liu and co-workers tested the antibacterial activity of graphene-based nanomaterials in aqueous dispersion towards *E. coli*. Here, graphene oxide showed to have more than 2.5-fold loss of bacteria viability compared with that of graphite⁴³). The smaller activity of graphite could be attributed to the aggregation of graphene sheets, which for this material are in the micro-sizes leading to a sizes dependent toxicity. Additionally, when nanoparticles are tightly chemically bonded to a suitable matrix, as for example grapheme sheets within graphite, they can still demonstrate unique e.g. antibacterial properties but their environmental risks are decreased due to the limited mobility in the environmental media. Graphite is a common and widely used material with relatively low damaging effects for human health or the environment⁴⁴). For this and considering that to the best of the authors knowledge there is little investigation about graphite toxicity, graphite was chosen as a tested material for endodontic therapy

For the antibacterial assays, amoxicillin was used as a control. Recent studies have shown that various *Staph. aureus* strains can express beta-lactamase, an enzyme that hydrolyzes beta-lactams⁴⁵). Because of this beta-lactamase expression, reported minimum inhibitory concentrations (MICs) of amoxicillin against *Staph. aureus* have ranged from 31.250 to over 100 µg/mL⁴⁶). In this work we used a concentration of amoxicillin that far exceeds the MIC for *Staph. aureus* hence the amoxicillin should exhibit an inhibitory effect against bacteria. Hence, in order to obtain results in accordance with ISO-22196, bacteria were incubated for only 2 h in contact with the testes materials. This short incubation period was chosen in this work considering that longer ones (24h) showed no colony formation on the agar plate (data not shown). Bacterial growth in contact with the tested powders was reduced approximately in 1.5 orders of magnitude compared with bacteria growth on PMMA control disks (Fig. 2). Also, it can be seen that ZnO and Gt activities are similar to amoxicillin antibacterial activity, which suggest that both tested powders behave alike (considering there is no significant difference between them, with $p > 0.05$) against *Staph. aureus*. Both of them with the inherit advantage of not inducing bacterial resistance.

TEM images were used to further study microorganism growth. Results showed that bacteria in contact with the bare PMMA disk presented a normal growth (Fig. 3a,b). For microorganisms in contact with ZnO powder, TEM photographs revealed that the cytoplasm membrane shrank or detached from the cell wall, cell membrane was disrupted and an electron-light region appeared in the center of the cells, with condensed material positioned in the center of it (Fig. 3c,d). A similar phenomenon occurred for silver treated *E. coli* and *Staph. aureus* cells. Feng suggested that low density region formation is a mechanism of defense, by which the bacteria conglomerates its DNA to

protect it from toxic compounds when the bacteria sense a disturbance of the membrane³⁶).

It is known that the replication on DNA molecules is effectively conducted when DNA molecules are in a relaxed state as seen in figure 3, a bacteria in contact with PMMA control samples. In a condensed form, like the one seen in microorganism treated with ZnO, DNA molecules lose their replicating activity which would explain one of its antibacterial action mechanisms. Interestingly, more research should be done to confirm if the condensed material corresponds to DNA molecules, (Fig. 3d). Hence, this behavior could be due to the formation of micro-sizes ZnO clusters due to material agglomeration. The presence of bigger particles would also have antibacterial activity. Although, evidence of cell damage and morphology changes in bacteria treated with ZnO, makes it clear that some particles were still in the nano-sizes. Hence, the reduction on CFU seen for bacteria in contact with ZnO could be due to: 1) alteration in the normal distribution of DNA molecules as a response of external toxic micro-sizes compounds leading to a reduction in proliferation rate, and 2) diminution in the amount of viable cells due to nano-sizes particles that penetrate and disrupt cell membrane producing leakage of its cytoplasm contents.

On the contrary, Gt plaques showed some membrane disruption in a few cells but no modification in the cytoplasm distribution was seen (Fig. 3e,f), which would suggest that the antibacterial mechanism could be due to a direct contact with the material and hence mechanical disruption of membrane, or due to environmental alterations which would lead its disruption. Glutathione (GSH) is a cell antioxiide widely used as an oxidative stress indicator⁴⁷⁻⁴⁹). Liu and co-workers used GSH oxidation to examine the possibility of ROS-independent oxidative stress mediated by graphene-based materials. They showed that the antibacterial activity of graphite is much higher than that of graphite oxide and correlated this to the electrical properties of semi-metallic graphite. The same behavior was reported in single wall carbon nanotube samples⁴⁷). Hence, according to literature, the reduction on CFU in Gt samples performed in the current work could be due to disruption of a specific antimicrobial process by oxidizing a vital component as glutathione without ROS production, which would lead to oxidative stress and membrane disruption. Further studies should be performed in order to confirm the influence of this mechanism.

Histologically, the tissue response was assessed at 3, 7 and 28 d. Silicone tubes were used in this study considering they can be cut using a microtome and within this process keep the shape of the tissue, which constitutes an advantage over polyethylene tubes. Moreover, their biocompatibility has already been proven^{50,51}) and were further confirmed within this study. Calcium hydroxide was used as positive control and tissue response was the same to the Holland study²³). In direct contact with conjunctive tissue it has shown to produce necrosis (Fig. 4a,b). Afterward, the inflammatory reaction removed the dead tissue and at 28 d, a fibrotic scar with calcification areas replaced the original architecture (Fig. 4c).

At 3 d, ZnO induced necrosis (Fig. 4d). At 7 d, the areas of dead tissue were increased (Fig. 4e and Fig. 5b), perhaps by dissolution of components of ZnO, that enhanced ROS generation and the production of pro-inflammatory cytokines (TNF, IL-6, IFN and IL-17)⁵²). At 28 d, fibroblast cells, collagenous fibers and vascular proliferation were found next to the end of the tubes (Fig. 4f and Fig. 5b) which would be related to tissue regeneration, in contrast with the formation of a fibrotic scar seen in Ca(OH)₂ samples (Fig. 5a). Similar findings were informed by Augustine in wound skin healing model⁵³) and by Sousa in wound bone healing⁵⁴). Also, the presence of inflammatory cells and new vascular formation surrounding ZnO particles (Table 1) leading to

an unresolved inflammation could be related to the dissolution of ZnO and hence ROS generation. This was also observed by Augustine⁵⁵⁾ and Barui⁵⁶⁾, who suggested that ROS generation, especially of H₂O₂, by ZnO nanoparticles might be the plausible mechanism for in vitro and in vivo angiogenesis. Hence, this unresolved chronic inflammation would lead to the lack of capsule.

The Gt produced initially a small area of necrosis in the connective tissue (Fig. 4i). Moreover, the necrosis was higher in those tubes implanted in contact with fatty tissue. The foreign body reaction was expressed from d 7, similar observations were reported by Anderson *et al.*⁵⁷⁾, with histiocytes and giant cells that limit and engulf the material. At 28 d, the presence of giant cell reaction (Fig. 4k), infiltration of chronic cell (Table 1) and the capsule formation. The size, irregular shape, and the lack of solubility of material may be the causes of the formation of giant cells granulomas⁵⁸⁾.

In this work, it was shown that ZnO and Gt powders have an efficient antibacterial activity. Regarding biocompatibility, Gt show the Absence of biocompatibility. On the other hand, ZnO samples demonstrated to improve wound healing by enhancing tissue regeneration. Hence, ZnO nano-powder could be considered as a potential material in regenerative endodontic field. Further studies should be carried out to verify their safety regarding long term exposures.

Acknowledgements

Financial support from National Agency for Scientific and Technological Promotion (PDTs 2016 N°574) is acknowledged. Also this study is jointly funded by the Japan Society for Promotion of Science (JSPS) KAKENHI Grant-in-Aid for Scientific Research (16K11441) and (16K20577). Further, authors would like to thank Eng. B. Felice for correcting the language of this paper and Dr. Susana Gutierrez from Dentistry Faculty for providing the Staph. aureus strain and for her advice.

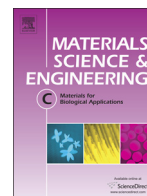
Conflict of Interest

The authors have declared that no COI conflict exists.

References

1. Siqueira JF, Rôças IN, Santos SRLD, Lima KC, Magalhães F a C and de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 28: 181-184, 2002
2. Yazdi KA, Sabeti M, Motahary P, Kolahdouzan A, Shayesteh M and Shokouhinejad N. Subcutaneous tissue responses to three endodontic irrigants: A comparative study. *Iran Endod J* 7: 144-148, 2012
3. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M and Ørstavik D. Bacterial penetration along different root canal filling materials in the presence or absence of smear layer. *Int Endod J* 41: 32-40, 2008
4. Kishen A, Shi Z, Shrestha A and Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod* 34: 1515-1520, 2008
5. Shrestha A, Zhilong S, Gee NK, and Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod* 36(6):1030-5, 2010
6. Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C and Punnoose A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl Phys Lett* 90 (21): 1-8, 2007
7. Lee DK, Kim SV, Limansubroto AN, Yen A, Soundia A, Wang CY, Shi W, Hong C, Tetradis S, Kim Y, Park NH, Kang MK and Ho D. Nanodiamond-gutta percha composite biomaterials for root canal therapy. *ACS Nano* 9(11):11490-11501, 2015
8. Dong L, Henderson A and Field C. Antimicrobial activity of single-walled carbon nanotubes suspended in different surfactants. *J Nanotechnol* 2012: 1-7, 2012
9. Shvedova AA, Pietroiusti A, Fadeel B and Kagan VE. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 261: 121-133, 2012
10. Gurunathan S, Han JW, Abdal Dem A, Eppakayala V and Kim JH. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomed* 7: 5901-5914, 2012
11. Rotern A. Effect implant material properties on the performance of a hip joint replacement. *J Med Eng Technol* 18 (6): 208-217, 1994
12. Liu K, Li Y, Xu F, Zuo Y, Zhang L, Wang H and Jianguo L. Graphite/poly (vinyl alcohol) hydrogel composite as porous ringy skirt for artificial cornea. *Mater Sci Eng C* 29: 261-266, 2009
13. Raghupathi KR, Koodali RT and Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir* 27: 4020-4028, 2011
14. Marjeta Č, Hribar G, Caserman S and Orel ZC. Morphological impact of zinc oxide particles on the antibacterial activity and human epithelia toxicity 52: 204-211, 2015
15. Silveira CMM, Pinto SCS, Zedebski R de AM, Santos FA and Pilatti GL. Biocompatibility of four root canal sealers: A histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J* 22: 21-27, 2011
16. Desai S and Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: A review. *J Endod* 35: 475-480, 2009
17. Karnovsky MJ. This week's citation classic. *J Cell Biol* 27 (A): 137, 1965
18. Venable JH and Coggeshall R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 25: 407-408, 1965
19. Council NR. Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition. The National Academies Press, Washington, D.C, USA, 2010, pp11-88
20. Zaazou MH, Zaki DY, Mostafa AA, Mahmoud AA, Basha M and Khallaf M. In vivo biocompatibility evaluation of injectable nano-hydroxyapatite/poloxamer 407 based formulations. Part II. *J Appl Sci Res* 9: 5269-5276, 2013
21. Cunha SA, Rached FJA, Alfredo E, León JE and Perez DE da C. Biocompatibility of sealers used in apical surgery: A histological study in rat subcutaneous tissue. *Braz Dent J* 22: 299-305, 2011
22. Estrela C and Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci* 11: 269-282, 2003
23. Holland R, Nery M J, De Mello W and De Souza V. Root canal obturation with calcium hydroxide. *Oral Surg* 47: 87-92, 1979
24. Ohara-Nemoto Y, Haraga H, Kimura S and Nemoto TK. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal-oral trafficking of the bacteria. *J Med Microbiol* 57: 95-99, 2008
25. Sundqvist G, Figdor D, Persson S and Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85: 86-93, 1998
26. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, Hasan H and Mohamad D. Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Lett* 7: 219-242, 2015
27. Zhang Y, Nayak TR, Hong H and Cai W. Biomedical applications of zinc oxide nanomaterials. *Curr Mol Med* 13:1633-1645, 2013
28. Kumar N, Dorfman A and Hahm J. Ultrasensitive DNA sequence

- detection using nanoscale ZnO sensor arrays. *Nanotechnol* 17: 2875-2881, 2006
29. Wong RH, Palamara JE, Wilson PR, Reynolds EC and Burrow MF. Effect of CPP-ACP addition on physical properties of zinc oxide non-eugenol temporary cements. *Dent Mater. Acad Dent Mater* 27: 329-338, 2011
30. Sevinç BA and Hanley L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. *J Biomed Mater* 94: 22-31, 2010
31. Tam KH, Djurišić AB, Chan CMN, Xi YY, Tse CW, Leung YH, Chan WK, Leung FCC and Au DWT. Antibacterial activity of ZnO nanorods prepared by a hydrothermal method. *Thin Solid Films* 516: 6167-6174, 2008
32. Colon G, Ward BC and Webster TJ. Increased osteoblast and decreased *Staphylococcus epidermidis* functions on nanophase ZnO and TiO₂. *J Biomed Mater Res A* 78: 595-604, 2006
33. Jones N, Ray B, Ranjit KT and Manna AC. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 279:71-76, 2008
34. Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga M V., Li D and Pedro JJ. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Res* 42: 4591-4602, 2008
35. Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF and Fiévet F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett* 6: 866-870, 2006
36. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN and Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 52: 662-668, 2000
37. Hurt RH, Monthieux M and Kane A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. *Carbon NY* 44: 1028-1033, 2006
38. Akhavan O and Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano* 4: 5731-5736, 2010
39. Liu Y, Zhao Y, Sun B and Chen C. Understanding the toxicity of carbon nanotubes. *Acc Chem Res* 46: 702-713, 2013
40. Nayak TR, Andersen H, Makam VS, Khaw C, Bae S, Xu X, Lai P, Ahn JH, Hong BH, Pastorin G and Ozyilmaz B. Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS Nano* 5 (6): 4670-4678, 2011
41. Park S, Mohanty N, Suk JW, Nagaraja A, An J, Piner RD, Cai W, Dreyer DR, Berry V and Ruoff RS. Biocompatible, robust free-standing paper composed of a TWEEN/graphene composite. *Adv Mater* 22: 1736-1740, 2010
42. Olteanu D, Filip A, Socaci C, Biris AR, Filip X, Coros M, Rosu MC, Pogacean F, Aib C and Baldea L. Cytotoxicity assessment of graphene-based nanomaterials on human dental follicle stem cells. *Colloids Surfac B Biointerfac* 136: 791-798, 2015
43. Liu S, Zeng TH, Hofmann M, Burcombe E, Wei J and Jiang R. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide. *Membrane Oxidat Stress* 9: 6971-6980, 2011
44. Dědková K, Janíková B, Matějová K, Čabanová K, Váňa R, Kalup A, Hundáková M and Kukutschová J. ZnO/graphite composites and its antibacterial activity at different conditions. *J Photochem Photobiol B Biol* 15: 256-263, 2015
45. Fuda CCS, Fisher JF and Mobashery S. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. *Cell Mol Life Sci* 62: 2617-2633, 2005
46. Olajuyigbe OO and Afolayan AJ. Synergistic interactions of methanolic extract of *Acacia mearnsii* de wild. with antibiotics against bacteria of clinical relevance. *Int J Mol Sci* 13: 8915-8932, 2012
47. Vecitis CD, Zodrow KR, Kang S and Elimelech M. Electronic-structure-dependent bacterial cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes. *ACS Nano* 4: 5471-5479, 2010
48. Lyon DY and Alvarez PJJ. Fullerene water suspension (nC) exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation fullerene water suspension (nC 60) exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation 42: 8127-8132, 2008
49. Carmel-harel O and Storz G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* 54: 439-461, 2000
50. Zmener O, Pameijer CH, Kokubu GA and Grana DR. Subcutaneous connective tissue reaction to methacrylate resin-based and zinc oxide and eugenol sealers. *J Endod* 36: 1574-1579, 2010
51. Osvaldo Z, Cornelis P, Kokubu G and Gabriel GD. Biocompatibilidad de conos de Resilon y conos de gutapercha en el tejido celular subcutáneo de la rata. Un estudio piloto Biocompatibility of Resilon and gutta-percha cones in the subcutaneous connective tissue of the rat. A pilot study. *Rev Asoc Odontol Argent* 98(5): 403-408, 2010
52. Roy R, Tripathi A, Das M and Dwivedi PD. Cytotoxicity and uptake of zinc oxide nanoparticles leading to enhanced inflammatory cytokines levels in murine macrophages: Comparison with bulk zinc oxide. *J Biomed Nanotechnol* 7: 110-111, 2011
53. Augustine R, Dominic EA, Reju I, Kaimal B, Kalarikkal N and Thomas S. Electrospun polycaprolactone membranes incorporated with ZnO nanoparticles as skin substitutes with enhanced fibroblast proliferation and wound healing. *RSC Adv* 4: 24777-24785, 2014
54. Sousa CJA, Pereira MC, Almeida RJ, Loyola AM, Silva ACA and Dantas NO. Synthesis and characterization of zinc oxide nanocrystals and histologic evaluation of their biocompatibility by means of intraosseous implants. *Int Endod J* 47: 416-424, 2014
55. Augustine R, Dominic EA, Reju I, Kaimal B, Kalarikkal N and Thomas S. Investigation of angiogenesis and its mechanism using zinc oxide nanoparticle-loaded electrospun tissue engineering scaffolds. *RSC Adv [Internet]. Royal Soc Chem* 4: 51528-51536, 2014
56. Barui AK, Veeriah V, Mukherjee S, Manna J, Patel AK, Patra S, Pal S, Murali S, Rana RK, Chatterjee S and Patra CR. Zinc oxide nanoflowers make new blood vessels. *Nanoscale* 4: 7861-7869, 2012
57. Anderson JM, Rodriguez A and Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20: 86-100, 2008
58. Sheikh Z, Brooks PJ, Barzilay O, Fine N and Glogauer M. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. *Materials (Basel)* 8: 5671-5701, 2015



In Vivo evaluation of adipogenic induction in fibrous and honeycomb-structured atelocollagen scaffolds



Andrea P. Rodríguez^{a,c}, Betiana Felice^{c,*}, María A. Sánchez^c, Hidetsugu Tsujigiwa^b, Carmelo J. Felice^c, Hitoshi Nagatsuka^a

^a Department of Oral Pathology and Medicine, Graduated School of Medicine and Dentistry, Okayama University, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 7008558, Japan

^b Department of Life Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 7000005, Japan

^c Laboratorio de Medios e Interfases, Departamento de Bioingeniería, Universidad Nacional de Tucumán, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Av. Kirchner 1800, Tucumán, Argentina T4000

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2015

Received in revised form 7 January 2016

Accepted 19 February 2016

Available online 22 February 2016

Keywords:

Adipose tissue engineering

White adipocytes

Myogenic origin

Atelocollagen

In vivo

ABSTRACT

Nowadays, soft tissue restoration techniques are mainly focused on volume regeneration instead of function recovering. So far, autologous fat transplant has been the most popular method although its multiple reported problems like volume and function loss. Adipose tissue engineering therefore emerges as a solution for development of biological substitutes for soft tissue which promotes not only volume regeneration but also function restoration with minimal consequences. Here we tested fibrous-structured atelocollagen (FSA) scaffolds and honeycomb atelocollagen (HCA) scaffolds for their ability to induce adipogenesis *in vivo*. Implants were subjected to histological and immunohistochemical assessment after 1, 2, and 4 weeks of implantation. Our studies showed that FSA scaffolds induced *in vivo* a markedly adipogenic response, whereas an acute inflammatory process was observed at HCA scaffolds without tissue regeneration detected within them. Our histological findings concerning FSA scaffolds clearly showed the presence of adipose-like tissue surprisingly composed by a mixture of brown-like and white-like adipocytes at week 2 whereas only white-like adipocytes at week 4. Subsequent positive Pax7 immunostaining at weeks 1 and 2 suggested the existence of a common myogenic progenitor shared by brown-like and white-like adipocytes observed. Then, in this work we present FSA scaffolds as a promising structure for brown and white adipose tissue engineering.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Contour defects caused by tumor resection, trauma or congenital abnormalities have represented an interesting challenge for health sciences. Until recently, restoration strategies of natural tissue were not often the primary goal in reconstruction; rather, restoration of soft tissue aesthetic function was targeted in order to minimize anxiety and negative psychological feelings associated with disfigurement [1,2].

Autologous fat tissue has been so far the most used repairing material for soft tissue defects. Although its use is logical in its approach, this method has not been consistently successful in patients. When autologous fat tissue is transplanted from one location to the defect site, the common occurrence is significant resorption of transplanted tissue over time, resulting in 40–60% of graft volume loss [3–5]. Then, only small defects can be corrected with this repairing material, and even these limited applications require repeated procedures to maintain the desired volume [3]. Adipose Tissue Engineering (ATE) therefore emerged like a promising technique for development of biological

substitutes which promote not only volume regeneration but also function restoration of soft tissues with minimal rejection.

Tissue regeneration by ATE is achieved not only by controlling cell sources and biochemical environment but also through suitable scaffolds, which are required for support, migration and proliferation of anchorage-dependent adipocytes and preadipocytes [2]. Scaffolds for ATE may be either synthetic or natural, regarding the biomaterial chosen for their construction. Up to date, synthetic scaffolds based on e.g. polylactic acid, hydrogels and poly(lactic-co-glycolic acid) have been used successfully in ATE [6–8]. Nevertheless, they have some disadvantages such as lack of mechanical integrity and stiffness mismatch compared to native tissue, lack of biodegradability or generation of acidic microenvironments upon degradation with eventual inflammatory reactions and implant rejection [9–11]. Therefore, biocompatibility and biomimeticity hold by natural scaffolds become a main advantage over aforementioned synthetic structures. Several natural biomaterials like e.g. fibrin, gelatin, hyaluronan and matrigel have been studied for such purpose [12–14]. However, collagen remains as the most widely used scaffold natural material for ATE given its ability to support adipogenesis from several cell sources [15–18]. An alternative collagen-based biomaterial with extremely low antigenicity is produced by telopeptide

* Corresponding author.

E-mail address: betiana_felice@yahoo.com.ar (B. Felice).

removal from natural collagen molecule and it is known as atelocollagen which has been used mainly for e.g. cartilage restoration, bone and connective tissue engineering [19–21]. Nevertheless, preliminary works of this group showed that atelocollagen scaffolds also enhanced bone and adipose tissue formation [22,23]. Therefore, in this study we investigate and systematically evaluate *in vivo* adipogenic induction ability of fibrous-structured atelocollagen (FSA) scaffolds and honeycomb atelocollagen (HCA) scaffolds as a first approach concerning adipose tissue restoration.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Twelve 4-week-old male severe combined immunodeficient (SCID) mice were used in this study in accordance with the Guidelines for Animal Experiments at Graduate School of Medicine and Dentistry Okayama University, Japanese Government Animal Protection and Management Law (No. 105) and Japanese Government Notification on Feeding and Safekeeping of Animals (No. 6).

2.2. Intramuscular implantation and explantation

FSA and HCA scaffolds (Fig. 1) of $3 \times 3 \times 2 \text{ mm}^3$ were used for this work (Koken, Japan). SCID mice were subjected to intramuscular anesthesia with Ketamine (Fuji Chemical Industry, Japan) and Dormitol (Meiji Seika, Japan). The skin of the legs was shaved and disinfected with 70% alcohol and iodine. Subsequently, the scaffolds were implanted into intramuscular pockets made by blunt dissection between *tibialis anterior* and *soleus* muscles. The animals were sacrificed with an overdose of ether at 1, 2, and 4 weeks after implantation. For hematoxylin–eosin (H&E) staining, specimens and surrounding tissues were removed, fixed by 4% paraformaldehyde. Then, the samples were embedded in paraffin, sectioned at $4 \mu\text{m}$ in thickness and finally stained.

2.3. Adipose tissue staining by Oil Red O

To assess adipogenic differentiation, lipid deposits were visualized through Oil Red O staining. Briefly, frozen sections were prepared by embedding implants in Tissue Tek (Sakura Finetek, USA) followed by specimen freezing in liquid nitrogen bath and trimming. Then, they were dried with warm air and embedded in 60% propanol for 2 min. Subsequently, sections were stained with 0.3% Oil Red O solution at 37°C for 7 min, provided by Kayayama Chemical (Japan). The dye was washed out with 60% propanol for 2 min. Thereafter, sections were rinsed in distilled water, stained with Mayer's hematoxylin and mounted with Aqueous Mounting Medium.

2.4. Transmission Electron Microscopy (TEM)

TEM of implanted samples was performed by negative staining. Specimens and surrounding tissues were pre-fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde solution, post fixed with 1% osmium tetroxide dehydrated with a series of alcohols and infiltrated with resin. The resin sample block was trimmed, thin-sectioned thickness of 70 nm, and collected on formvar-coated copper grids. Before examining under the TEM, these grids were stained by uranyl acetate and lead citrate, followed by blotting with a filter paper and air drying. Samples were examined with Philips CM10 at 200 kV.

2.5. Immunohistochemical staining of CD34 and Pax7

The sections were immunostained with monoclonal antibodies against CD34 (abcam, UK) and Pax7 (Santa Cruz Biotechnology, USA) using Vectastain ABC Rat Kit method (Avidin-Biotin-peroxidase Complex, USA). The main steps were as follows: (1) inactivation of endogenous peroxidase with hydrogen peroxide in methanol for 30 min; (2) the activation of antigenicity was done with microwave treatment before blocking nonspecific protein binding with rabbit normal serum and horse normal serum, respectively, for 10 min at room temperature; (3) incubation with the primary antibody at 4°C overnight. The optimal dilutions of each primary were (CD34) 1:100 and (Pax7) 1:200; (4) incubation with anti-rat IgG (1:200) and anti-mouse IgG (1:200), respectively, for 30 min; (5) incubation with ABC at a dilution of 1:50 for 30 min; and (6) treatment with DAB color development and counterstaining with Mayer's hematoxylin.

3. Results

3.1. Histological examination

In Vivo response to FSA and HCA scaffolds at weeks 1, 2 and 4 was initially studied through H&E staining. As it is observed in Fig. 2, low or no inflammatory reaction was noticed at FSA scaffold periphery and bulk. At week 1, spindle cells attached to FSA scaffold fibers were stained whereas at week 2 numerous rounded cells were colored. Some of them contained multiple cytoplasmic lipid droplets surrounding the nucleus, as it was confirmed by Oil Red O assay (Fig. 3). Strikingly, H&E assay revealed at week 4 the absence of such cells as well as the presence of white-like adipose tissue, composed by white-like adipocytes with single large cytoplasmic lipid droplets and flattened stained nucleus located on the cell periphery. Similar responses were observed at all FSA specimens.

Oppositely, no tissue regeneration at HCA specimens in addition to an acute inflammatory response at weeks 2 and 4 was observed (Fig. 4). Giant bodies stained at week 4 might indicate scaffold

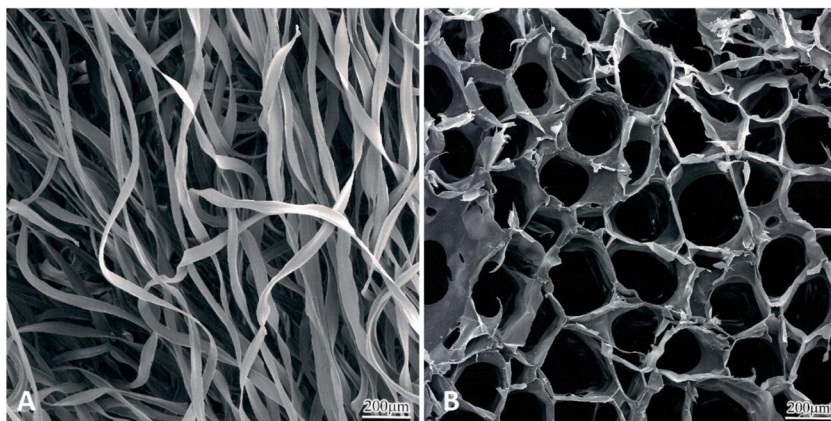


Fig. 1. SEM micrograph showing the (A) fibrillar microstructure of FSA scaffolds; and (B) honeycomb-like structure of HCA scaffolds.

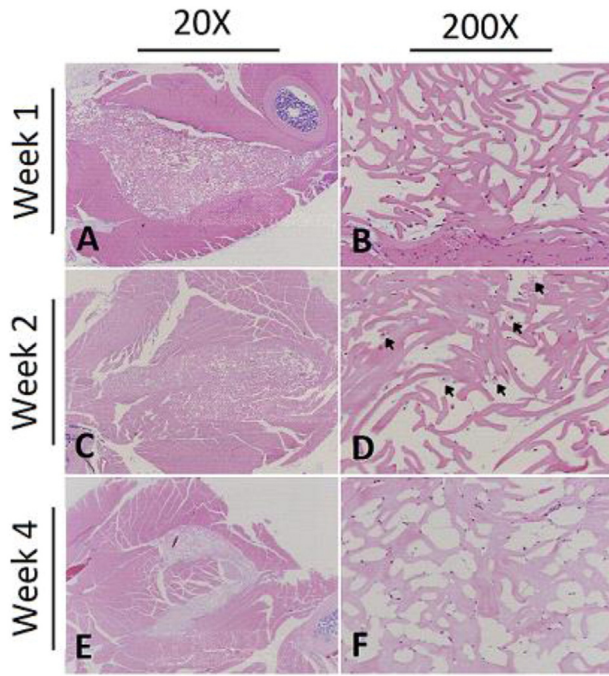


Fig. 2. Histological examination of implant specimens of FSA scaffolds at different weeks (Hematoxylin & Eosin staining). **(A and B) Week 1:** Note the presence of stained spindle cells attached to scaffold fibers. A weak inflammatory reaction is only seen at scaffold boundaries. **(C and D) Week 2:** Black arrows indicate brown-like adipocytes within the scaffold, with multiple cytoplasmic lipid droplets. Note the presence of some small spherical cells close to scaffold fibers. No inflammatory reaction is observed. **(E and F) Week 4:** Multiple white-like adipocytes within scaffold bulk are observed, with large cytoplasmic lipid droplets. Bars at the top of micrographs show respective magnifications. (For color interpretation, the reader is referred to the web version of this article.)

degradation though cell phagocytosis. HCA scaffolds were negative stained for Oil Red O (data not shown).

3.2. TEM

Further analysis of cell features at week 2 in FSA specimens was performed by TEM. Surprisingly, sample exploration revealed two cell phenotypes at week 2: (1) brown-like adipocytes containing small cytoplasmic lipid droplets and numerous mitochondrias with abundant cristae (Fig. 5A); and (2) white-like adipocytes, with a single large cytoplasmic lipid droplet, few mitochondrias and a flattened nucleus located at cell periphery (Fig. 5B).

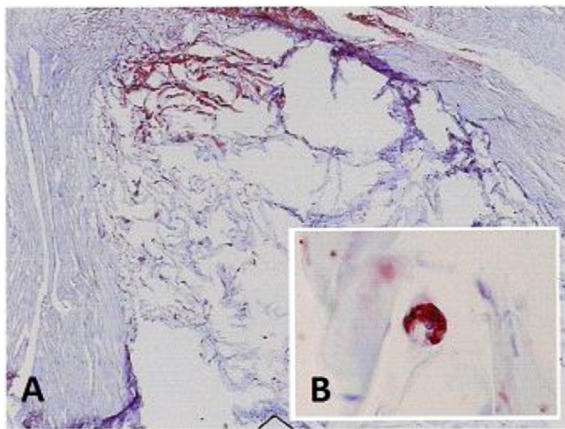


Fig. 3. Oil Red O staining of FSA scaffolds at week 2. **(A and B)** Multiple cytoplasmic lipid droplets within the cells are stained, as it is clearly shown at the zoomed micrograph. (For color interpretation, the reader is referred to the web version of this article.)

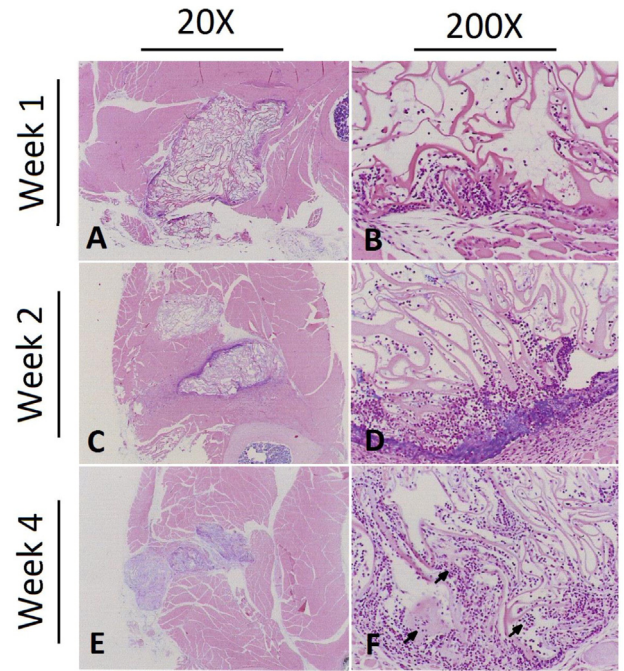


Fig. 4. Histological examination of implant specimens of HCA scaffolds at different weeks (Hematoxylin & Eosin staining). **(A and B) Week 1:** A markedly inflammatory reaction is observed mainly at scaffold periphery. Few spindle-like cells are only stained at scaffold borders. **(C and D) Week 2:** An acute inflammatory response at the periphery is observed. Some inflammatory cells are stained within scaffold bulk. **(E and F) Week 4:** Generalized inflammatory response is observed at the periphery as well as at scaffold bulk. Black arrows indicate giant bodies within scaffold bulk. Bars at the top of micrographs show respective magnifications. (For color interpretation, the reader is referred to the web version of this article.)

3.3. Immunohistochemical examination

Immunohistochemical analysis was necessary in order to better understand former findings in FSA scaffolds. As shown in Fig. 6, Pax7 immunostaining revealed that such protein was expressed by spindle cells and brown-like adipocytes observed in FSA specimens at weeks 1 and 2 respectively. However, Pax7 assay was negative for white-like adipocytes in FSA scaffolds at week 4. HCA specimens, as it is shown in Fig. 6, were negative stained for Pax7 at weeks 1, 2 and 4.

Regarding CD34 immunoassay performed on FSA specimens, many endothelial cells in developing vessels at scaffold periphery were clearly positive with CD34 immunostaining at weeks 1, 2 and 4 according to Fig. 7. Contrastingly, angiogenesis processes were not observed within scaffolds bulk as the negative reaction for CD34 assay indicated. HCA specimens showed vessel development at scaffold periphery at weeks 1 and 2 as well. However, in contrast with FSA specimens, new vessels within HCA scaffold bulks were positive stained for CD34 at week 4, as it is shown in Fig. 7F.

4. Discussion

The major findings of the present study suggest, for the first time, that FSA scaffolds without pre-seeded cells successfully induce adipogenesis at intramuscular *in vivo* environment. Compared against HCA scaffolds, fibrous microstructure of FSA scaffolds definitively aroused as a key factor for adipogenic response development. H&E staining as well as Oil Red O assay proved the existence of adipose-like tissue within FSA scaffold bulk. Strikingly, TEM micrographs revealed differences at the tissue cell composition between week 2 and 4, with a mixture of brown-like and white-like adipocytes at week 2 whereas at week 4 a clear predominance of white-like adipocytes. Latter observations in

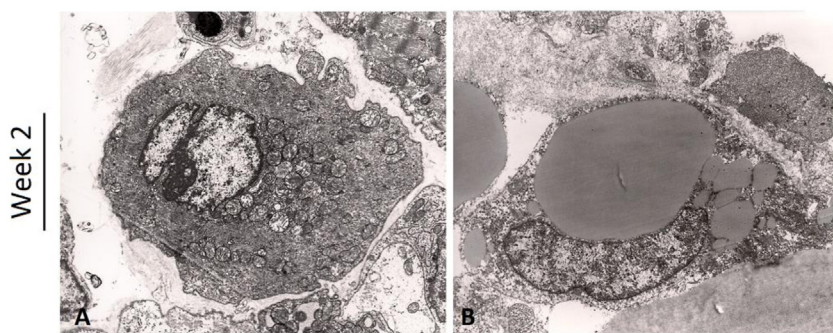


Fig. 5. TEM micrographs of cells observed within FSA scaffolds bulk at week 2. **(A)** Brown-like adipocyte containing numerous mitochondrias with abundant cristae and few and small cytoplasmic lipid droplets. **(B)** Early white-like adipocyte, with a large cytoplasmic lipid droplet surrounded by medium-size lipid droplets merging between each other. Observe the flattened nucleus close to the cell periphery.

addition to the positive Pax7 immunostaining of cells within FSA scaffolds at week 1 and 2 suggest a common myogenic progenitor shared by brown-like and white-like adipocytes.

For many years it was considered that Pax7 expression was restricted to myogenic cells and their muscular progeny given that it is a key protein for their survival and expansion [24–26]. However, Lepper et al. demonstrated that Pax7 is not exclusively expressed by these cells but also transiently by brown adipocytes during their early stages [27]. Subsequently, it was accepted a model arguing that brown adipocytes could be delineated from white adipocytes by their ancestral expression of myogenic proteins (e.g. Pax7, Myf5). Such theory was valid until the findings of Sánchez-Guraches et al., which clearly proved the existence of subsets of white adipocytes originated by myogenic lineages similar to those responsible for brown adipocytes proliferation [28,29]. Therefore, our results certainly support such approach regarding white and brown adipocytes common myogenic ancestors and suggest a migration of myosatellite cells from muscles surrounding the

implants which subsequently gave rise to the observed adipocyte-like cells.

Regarding the observed cell composition differences, the apparently prevalence of white adipose tissue over brown at week 4 might have been induced by the lack of vascularization within FSA scaffolds bulk. It is known that white adipocytes grow up in hypoxic environments with low irrigation [30]. Furthermore, the enlarged they are the less irrigated they become [31]. In contrast, brown adipose tissue is highly vascularized containing many small capillaries which individually surround brown adipocytes so that to deliver anti-apoptotic molecules (e.g. norepinephrine), adequate amounts of oxygen and lipids necessary for heat production. Moreover, the delivery to the organism of the heat produced by brown adipocytes is equally dependent on the heated blood leaving the tissue [32,33]. Therefore, the lack of angiogenesis at scaffold bulk, shown by CD34 immunostaining, could have induced the enlarging of white-like adipocytes as well as apoptosis of brown-like adipocytes observed at week 2.

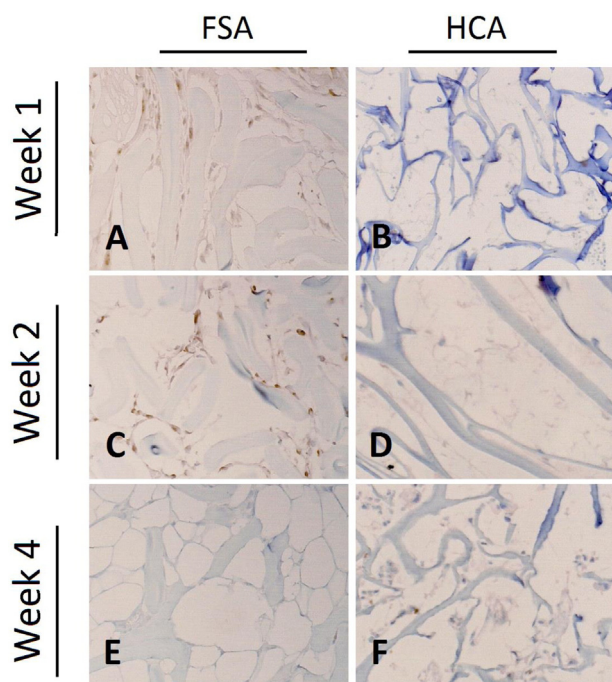


Fig. 6. Immunostaining for Pax7 of FSA scaffolds and HCA scaffolds at **(A and B)** week 1, **(C and D)** week 2 and **(E and F)** week 4. At FSA scaffolds note that spindle cells at week 1 and brown-like adipocytes at week 2 are positive stained for Pax7, whereas at week 4 all specimens were negative stained for such protein. HCA scaffolds were negative stained for Pax7 at all weeks. For color interpretation, the reader is referred to the web version of this article.

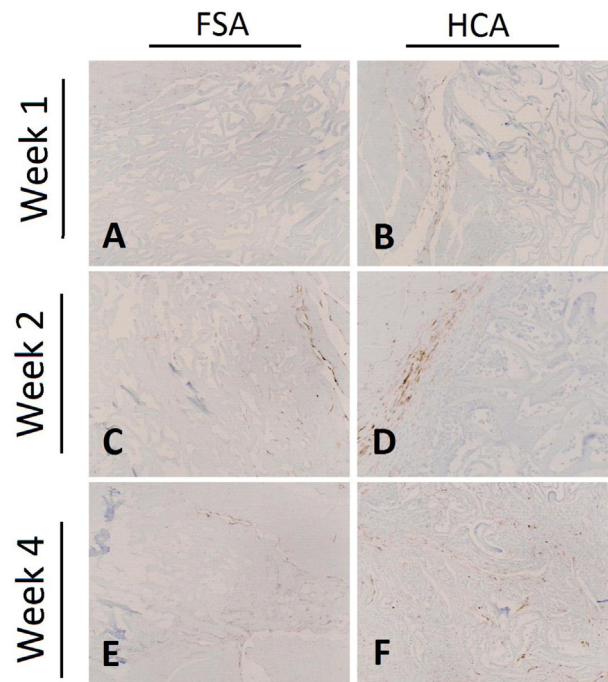


Fig. 7. Immunostaining for CD34 of FSA and HCA scaffolds at **(A and B)** week 1, **(C and D)** week 2 and **(E and F)** week 4. Positive staining exclusively at the periphery of FSA scaffolds and weeks 1, 2 and 4. Note the low vessel development within FSA scaffold bulk, considering the weak immunostaining inside the structures. HCA scaffolds show vessel development within scaffold bulk at week 4. For color interpretation, the reader is referred to the web version of this article.

Positive adipogenic reaction at FSA scaffolds compared against negative adipogenic response for HCA scaffolds in addition to the acute inflammatory process observed clearly suggested that fibril organization of atelocollagen induced myosatellite-like cell migration followed by adipose tissue regeneration. Some authors demonstrated that myosatellite cells migration might be induced either by tissue injuring or by new fibrous tissue development [34,35]. However, as at HCA scaffolds there were no spindle-like cells observed in addition to negative Pax7 immunostaining, myosatellite-like cells migration induced by injured tissue could be discarded as hypothesis. Hence, fibril organization of FSA scaffolds arises as apparent cause of cell migration from surrounding muscles. Additionally, fibril organization might have induced myosatellite-like cells differentiation into adipocytes considering several studies which have shown that when preadipocytes differentiate into adipocytes, extracellular matrix goes from spiny to fibril organization [36,37]. Therefore, it can be assumed that fibril organization of FSA scaffolds might have induced the attraction of myosatellite-like cells, which consequently gave rise to generation of adipose tissue [23,24,26,32].

Finally it should be noted that even though SCID mice were used as experimental animals, an acute inflammatory response was observed at HCA scaffolds in contrast to a weak reaction at FSA scaffolds. Such response was also registered after subcutaneous implantation performed by this group during previous studies [23]. Therefore, this work demonstrates that scaffold structure is also an essential parameter which influences inflammatory reaction. However, further assays are necessary in order to systematically evaluate additional parameters e.g. porosity, mechanical properties and fibers diameter capable to modify inflammatory response.

5. Conclusion

In this study, we evaluated through histological and immunohistochemical techniques FSA and HCA scaffolds. Our results demonstrated FSA scaffold ability to induce adipogenesis *in vivo* without pre-seeded preadipocytes or adipogenic factors. Compared against HCA scaffolds, it was demonstrated that fibril organization of FSA scaffolds was a key factor for adipogenic response development. In addition, it was shown that the primary adipose tissue obtained at FSA scaffolds was composed by a mixture of brown and white adipocytes which arise from a common myogenic ancestor. Hence, FSA scaffolds demonstrated to be a promising structure for adipose tissue engineering.

Acknowledgments

Research conduction of this study was supported by the Japan Society for the Promotion of Science (19/07217, Japan). Article preparation was financed by the National Agency for Science and Technology (PICT 2009 n°87, Argentina).

References

- [1] V.M. Hsu, C.A. Stransky, L.P. Bucky, I. Percec, Fat grafting's past, present, and future: why adipose tissue is emerging as a critical link to the advancement of regenerative medicine, *Aesthet. Surg. J.* 32 (2012) 892–899, <http://dx.doi.org/10.1177/1090820X12455658>.
- [2] C.T. Gomillion, K.J.L. Burg, Stem cells and adipose tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 6052–6063, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.033>.
- [3] C.J. Tabit, G.C. Slack, K. Fan, D.C. Wan, J.P. Bradley, Fat grafting versus adipose-derived stem cell therapy: distinguishing indications, techniques, and outcomes, *Aesthet. Plast. Surg.* 36 (2012) 704–713, <http://dx.doi.org/10.1007/s00266-011-9835-4>.
- [4] L. Flynn, K.A. Woodhouse, Adipose tissue engineering with cells in engineered matrices, *Organogenesis* 4 (2008) 228–235, <http://dx.doi.org/10.4161/org.4.4.7082>.
- [5] S.J. Hong, J.H. Lee, S.M. Hong, C.H. Park, Enhancing the viability of fat grafts using new transfer medium containing insulin and β -fibroblast growth factor in autologous fat transplantation, *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 63 (2010) 1202–1208, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2009.05.040>.
- [6] J. Xu, Y. Chen, Y. Yue, J. Sun, L. Cui, Reconstruction of epidural fat with engineered adipose tissue from adipose derived stem cells and PLGA in the rabbit dorsal laminectomy model, *Biomaterials* 33 (2012) 6965–6973, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.010>.
- [7] M. Frydrych, S. Román, S. MacNeil, B. Chen, Biomimetic poly(glycerol sebacate)/poly(l-lactic acid) blend scaffolds for adipose tissue engineering, *Acta Biomater.* 18 (2015) 40–49, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.03.004>.
- [8] Y. Ogushi, S. Sakai, K. Kawakami, Adipose tissue engineering using adipose-derived stem cells enclosed within an injectable carboxymethylcellulose-based hydrogel, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 7 (2012) 884–892, <http://dx.doi.org/10.1002/term.1480>.
- [9] K. Mäder, S. Nitschke, R. Stösser, H.-H. Borchert, A. Domb, Non-destructive and localized assessment of acidic microenvironments inside biodegradable polyanhydrides by spectral spatial electron paramagnetic resonance imaging, *Polymer* 38 (1997) 4785–4794, [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)00003-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861(97)00003-7).
- [10] J.H. Choi, J.M. Gimble, K. Lee, K.G. Marra, J.P. Rubin, J.J. Yoo, et al., Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration, *Tissue Eng. Part B Rev.* 16 (2010) 413–426, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0544>.
- [11] K. Hemmrich, D. von Heimburg, Biomaterials for adipose tissue engineering, *Expert Rev. Med. Devices* 3 (2006) 635–645, <http://dx.doi.org/10.1586/17434440.3.5.635>.
- [12] A. Peterbauer-Scherb, M. Danzer, C. Gabriel, M. van Griensven, H. Redl, S. Wolbank, In vitro adipogenesis of adipose-derived stem cells in 3D fibrin matrix of low component concentration, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6 (2011) 434–442, <http://dx.doi.org/10.1002/term.446>.
- [13] E. Korurer, H. Kenar, E. Doger, E. Karaoz, Production of a composite hyaluronic acid/gelatin blood plasma gel for hydrogel-based adipose tissue engineering applications, *J. Biomed. Mater. Res. A* 00A (2013) 000–000.
- [14] J.L. Kelly, M.W. Findlay, K.R. Knight, A. Penington, E.W. Thompson, A. Messina, et al., Contact with existing adipose tissue is inductive for adipogenesis in matrigel, *Tissue Eng.* 12 (2006) 2041–2047, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2006.12.ft-111>.
- [15] D. Von Heimburg, M. Kuberka, R. Rendchen, K. Hemmrich, G. Rau, N. Pallua, Preadipocyte-loaded collagen scaffolds with enlarged pore size for improved soft tissue engineering, *Int. J. Artif. Organs* 26 (2003) 1064–1076.
- [16] L. Wang, J.A. Johnson, Q. Zhang, E.K. Beahm, Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8921–8931, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.035>.
- [17] C. Yu, J. Bianco, C. Brown, L. Fuetterer, J.F. Watkins, A. Samani, et al., Porous decellularized adipose tissue foams for soft tissue regeneration, *Biomaterials* 34 (2013) 3290–3302, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.056>.
- [18] K. Werner, M.G. Jakubietz, R.G. Jakubietz, K. Schmidt, C. Muhr, P. Bauer-Kreisler, et al., Toward reconstruction of the subcutaneous fat layer with the use of adipose-derived stromal cellseeded collagen matrices, *Cytotherapy* 16 (2014) 1700–1708, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.06.007>.
- [19] V. Maier, C.M. Lefter, S.S. Maier, M. Butnaru, M. Danu, C. Ibanescu, et al., Property peculiarities of the atelocollagen-hyaluronan conjugates crosslinked with a short chain di-oxirane compound, *Mater. Sci. Eng. C* 42 (2014) 243–253, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.027>.
- [20] Y. Tanaka, H. Yamaoka, S. Nishizawa, S. Nagata, T. Ogasawara, Y. Asawa, et al., The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage, *Biomaterials* 31 (2010) 4506–4516, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.028>.
- [21] Y. Arima, N. Uemura, Y. Hashimoto, S. Baba, N. Matsumoto, Evaluation of bone regeneration by porous alpha-tricalcium phosphate/atelocollagen sponge composite in rat calvarial defects, *Orthod. Waves* 72 (2013) 23–29, <http://dx.doi.org/10.1016/j.odw.2012.11.001>.
- [22] A.P. Rodríguez, L. Missana, H. Nagatsuka, M. Gunduz, H. Tsujigiwa, R. Rivera, et al., Efficacy of atelocollagen honeycomb scaffold in bone formation using KUSA/A1 cells, *J. Biomed. Mater. Res. A* 77A (2006) 707–717.
- [23] A.P. Rodríguez, H. Tsujigiwa, S.S. Borkosky, P.P. Han, R. Tamamura, M. Gunduz, et al., Influence of three-dimensional scaffold on bone induction by KUSA/A1 cells, *J. Hard Tissue Biol.* 13 (2004) 5, <http://dx.doi.org/10.2485/jhtb.13.91>.
- [24] F. Relaix, D. Rocancourt, A. Mansouri, M. Buckingham, A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells, *Nature* 435 (2005) 948–953, <http://dx.doi.org/10.1038/nature03594>.
- [25] R. Sambasivan, R. Yao, A. Kissenpfennig, L. Van Wittenberghe, A. Paldi, B. Gayraud-Morel, et al., Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration, *Development* 138 (2011) 3647–3656, <http://dx.doi.org/10.1242/dev.073601>.
- [26] C. Lepper, T.A. Partridge, C.-M. Fan, An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration, *Development* 138 (2011) 3639–3646, <http://dx.doi.org/10.1242/dev.067595>.
- [27] C. Lepper, C.M. Fan, Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells, *Genesis* 48 (2010) 424–436, <http://dx.doi.org/10.1002/dvg.20630>.
- [28] J. Sanchez-Gurmaches, C.M. Hung, C.A. Sparks, Y. Tang, H. Li, D.A. Guertin, PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors, *Cell Metab.* 16 (2012) 348–362, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.003>.
- [29] J. Sanchez-Gurmaches, D.A. Guertin, Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2014 (1842) 340–351, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.027>.
- [30] D.W. Fawcett, A comparison of the histological organization and cytochemical reactions of brown and white adipose tissues, *J. Morphol.* 90 (1952) 363–405.
- [31] G.H. Goossens, The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance, *Physiol. Behav.* 94 (2008) 206–218, <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.10.010>.
- [32] B. Cannon, Brown adipose tissue: function and physiological significance, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 277–359, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>.
- [33] S.R. Farmer, Molecular Determinants Of Brown Adipocyte Formation And Function Molecular Determinants Of Brown Adipocyte Formation And Function, 2008 1269–1275, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1681308>.

- [34] J.L. Elster, C.R. Rathbone, Z. Liu, X. Liu, H.H. Barrett, R.P. Rhoads, et al., Skeletal muscle satellite cell migration to injured tissue measured with ^{111}In -oxine and high-resolution SPECT imaging, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 34 (2013) 417–427.
- [35] H. Yin, F. Price, M.A. Rudnicki, Satellite cells and the muscle stem cell niche, *Physiol. Rev.* 93 (2013) 23–67, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>.
- [36] S. Miettinen, J.R. Sarkanen, N. Ashammakhi, Adipose tissue and adipocyte, *Top. Tissue Eng.* 4 (2008) 1–26.
- [37] N. Kawaguchi, C. Sundberg, M. Kveiborg, B. Moghadaszadeh, M. Asmar, N. Dietrich, et al., ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating beta1 integrin function, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 3893–3904, <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00699>.



Hidetsugu Tsujigiwa is currently a researcher and professor at the Okayama University of Science (Japan). He obtained his PhD degree at Okayama University (Japan). Hard tissue, stem cells and tissue regeneration have been for years his research fields. Nowadays, he is focused on the study of molecular mechanisms concerning tumor microenvironments toward non-invasive therapies development.



Andrea P. Rodríguez is an assistant researcher in the National Scientific and Technical Research Council (CONICET, Argentina) and associate professor at Bioengineering Department in the National University of Tucumán (UNT, Argentina). She obtained her Ph.D. at the Department of Oral Pathology and Medicine, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Japan. Her research interests include tissue engineering, cell culture and cell-biomaterial interactions.



Carmelo J. Felice is a senior researcher at the National Scientific and Technical Research Council (CONICET, Argentina) and principal professor at Bioengineering Department in the National University of Tucumán (UNT, Argentina). His main research field is bioimpedancimetry applied to biosensors, neurophysiology and tissue engineering.



Betiana Felice is currently a Doctoral Research Fellow with the National Scientific and Technical Research Council (CONICET, Argentina). She obtained her degree as Biomedical Engineer from the National University of Tucumán (Argentina). Her research interests include medical polymers applied to tissue engineering, antimicrobial systems and drug delivery in addition to electrospinning, TiO_2 as photocatalyst, cell culture, microbiology and nanotechnology.




Hitoshi Nagatsuka is a senior researcher and professor at the Okayama University (Japan). Currently he is Chairman of the Oral Pathology Department (Okayama University, Japan) and responsible of numerous publications concerning bone tissue study and bone tissue regeneration.



María A. Sánchez is currently a Doctoral Research Fellow with the National Scientific and Technical Research Council (CONICET, Argentina). She obtained her degree as Biomedical Engineer from the National University of Tucumán (Argentina). Her research interests include surface treatment of titanium dioxide, osteo-active biomaterials, drug delivery, microbiology and nanotechnology.

SERS spectrum of imazalil. Experimental and quantum-chemical vibrational analysis

Gonzalo Díaz-Mirón¹ | María A. Sánchez^{2,3} | Doly M. Chemes¹ | Rosa M.S. Álvarez^{1,4} 

¹ Instituto de Química Física–Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, San Lorenzo 456, 4000 Tucumán, Argentina

² Laboratorio de Medios e Interfases, Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Universidad Nacional de Tucumán, Av. Independencia 1800, 4000 Tucumán, Argentina

³ Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), CONICET, Tucumán, Argentina

⁴ Instituto de Química del Noroeste Argentino (INQUINOA), CONICET, Tucumán, Argentina

Correspondence

Rosa M. S. Álvarez, Instituto de Química Física–Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, San Lorenzo 456, 4000 Tucumán, Argentina.
Email: myshukoalvarez@gmail.com; mysuko@fbqf.unt.edu.ar

Funding information

CONICET; Universidad Nacional de Tucumán; Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Grant/Award Number: PICT2012 N°299

Abstract

Imazalil [1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxyethyl)-1 H imidazole] is a systemic fungicide that is toxic to a number of plant pathogens, particularly species of *Penicillium*. Its activity is based on the inhibition of mold sporulation on fruit skin, which makes it one of the most commonly used fungicide in post-harvest citrus treatments for fruit preservation during storage, shipping, and marketing. Due to its wide application, the presence of imazalil needs to be monitored to avoid the excessive and/or improper use. This work reports a complete analysis of the Fourier-transform infrared spectroscopy and Raman spectra of imazalil as a pure compound as well as in the commercial product for agricultural use; the band assignment relays in the vibrational predictions acquired by quantum-chemical calculations (B3LYP/6-311 + g(2df, p)) for the imazalil molecule. An analytical application of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is also presented here. It is done so by using a novel, low-cost, and sensitive SERS-active substrate built with silver nanoparticles supported on a Si/ZnO nanowires platform to detect traces of imazalil in aqueous solutions. Comparison between the Raman and SERS spectra allowed the characterization of the interaction between the pesticide and the silver nanoparticle surface.

KEYWORDS

imazalil, pesticide, Raman, SERS

1 | INTRODUCTION

Several types of pesticide are commonly used in agriculture in order to protect crops and seeds against mold, blight, and other diseases that may appear during transportation and long-time deposit. This practice must be performed under strict control to ensure food safety, because the residues of pesticides remain in fruits causing environmental impact and public health risks. Although pesticides are designed to offer high specificity of action, their use is also manifested in innumerable undesirable effects as the appearance of resistant organisms and the

contamination of water and soil with carcinogenic, mutagenic, or toxic substances.^[1]

Current standard methods applied to control and monitor the excessive and/or improper use of pesticides and herbicides are based on HPLC and CG-MS techniques,^[2–5] which are known to be time consuming and require expensive experimental approach and sophisticated laboratories. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is a label-free detection method able to provide high sensitivity, offering remarkable potential for analytical applications in fast and simple protocols and relatively cheap experiments. These properties have lead SERS to

emerge in the last decades as a valuable alternative to detect contaminants in the food that reaches the consumer's table.^[6–11] The enhancement of the Raman scattering intensity of molecules at the trace level is propiated by the presence of a nanostructured metallic surface^[12] and is associated with localized surface plasmon resonance induced on the metal surface.^[13] This fact has made the development of SERS substrates a very active field in the pursuit of efficiency, sensibility, and ease of use.^[14]

Imazalil [1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxyethyl)-1 H imidazole] is one of the most commonly used fungicide in citrus postharvest treatments for the preservation of fruits during storage, shipment, and marketing, because it inhibits the sporulation of mold on the fruit skin.^[15] Imazalil is a systemic fungicide that is toxic to a number of plant pathogens, particularly species of *Penicillium*, by acting as an inhibitor of the ergosterol biosynthesis.^[16]

In spite of the wide application of imazalil and the consequent need for its control and monitoring, the vibrational analysis of this substance has not yet been published. In this work, we report the first complete study of the infrared and Raman spectra of the imazalil; the experimental data were complemented by quantum chemical calculations (B3LYP/6–311 + g(2df,p)) that provided the basis for the interpretation of the vibrational behavior of this molecule. The vibrational spectra of the agricultural commercial formula were also collected and compared with those of the pure imazalil. Because the inspiration of this work is based on the necessity to detect traces of this compound in fruits, a simple, low-cost, and sensitive SERS-active substrate built with silver nanoparticles (AgNPs) supported on a Si/ZnO nanowires platform was used. Aqueous dilutions of imazalil in trace concentrations were measured. Differences between SERS and normal Raman spectra, due to specific surface selection rules,^[17,18] allowed us to propose the preferred orientation of the adsorbed molecule on the substrate surface. The comparison between the SERS spectral profiles of diluted samples of the pure compound and of the agricultural commercial product is significantly important if the presence of imazalil is sought to be detected in fruits using this analytical method.

2 | MATERIALS AND METHODS

Pure imazalil PESTANAL (analytical grade, Sigma-Aldrich) was used in solid state for the Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and normal Raman spectral acquisition. The agricultural commercial product imazalil Fecundal 50 EC (50% p/v, emulsifiable concentrate) was

donated by the citrus company Citrícola San Miguel S. A., Argentina, and it was used without further purification to maintain the whole physical and chemical properties of the compound as normally used in fruit protection. A 10- μ l drop of the commercial product was used for the acquisition of the FTIR and normal Raman spectra. For SERS measurements, different concentration stock solutions of the agricultural commercial product in the 10^{-5} M (3 ppm, approximately) to 10^{-7} M (0.03 ppm, approximately) range were prepared with distilled water. The SERS spectrum of a 10^{-5} M aqueous solution of pure imazalil was also acquired.

2.1 | Instrumentation

The FTIR spectra were acquired from pure imazalil compound contained in KBr pellets and from a film formed by a drop of the agricultural commercial product supported between KRS-5 windows. A FTIR Atti Mattson Genesis Series spectrometer was used. In order to improve the signal/noise ratio, 60 and 32 spectra in the 4,000–400 cm^{-1} range (4- cm^{-1} spectral resolution) were collected for the emulsifiable concentrate and the solid samples, respectively.

A DXR Raman microscope (Thermo Fisher Scientific) was used for normal Raman and SERS measurements. Normal Raman spectra between 3,500 and 50 cm^{-1} were acquired from 10- μ l drops of the agricultural commercial product and from the solid sample of the pure imazalil. The samples in both states were deposited on gold-coated glass slides. Due to the strong fluorescence emission produced by the impurities contained in the commercial emulsifiable concentrate, the normal Raman spectrum of this sample was obtained by using a 780-nm excitation wavelength at 24 mW of power (5- cm^{-1} spectral resolution), instead of the 532-nm excitation (10 mW of power) used for the imazalil compound in pure state. Samples were focused with a 10 \times objective, and a 50- μ m slit aperture was used for spectral collection. Spectra were obtained from six different sampling points and each spectrum resulted from accumulating 20 expositions with an exposure time of 2 s each. For SERS measurements, Si/ZnO/AgNP substrates were used. Aqueous solutions of 10- μ l volume at different concentrations were dropped onto the substrates and then naturally dried at room temperature. SERS measurements were acquired from three randomly selected locations within each substrate and the average spectrum calculated to minimize heterogeneities in the metal deposition. A 532-nm excitation wavelength (10-mW power) was used. Each spectrum was obtained by accumulating 40 expositions of 2 s each. All measurements were performed at ambient temperature.

2.2 | Si/ZnO/AgNPs substrates

Substrates for SERS measurements were prepared following a protocol optimized in our laboratory, which will be published elsewhere with the corresponding characterization. Briefly, the first step consists of seeding ZnO onto undoped (111) oriented Si single crystal wafers, which were ultrasonically washed first with acetone, then in ethanol, and finally, distilled water. A 20- μ l volume of zinc acetate dihydrate (proanalysis, Cicarelli) in ethanol 0.006 M was dropped on the wafers and distributed by spin coating at 1,000 RPM for 10 s. After rinsing with ethanol, the wafers were incubated at 330 °C for 30 min to yield ZnO seeds onto the silicon substrate. In the second step, ZnO nanowires were grown by a hydrothermal method.^[19,20] Si wafers with ZnO seeds were immersed in an open crystallizing dish filled with an aqueous solution of zinc nitrate hydrate (0.025 M; proanalysis, Annedra) and hydroxymethylamine (0.025 M; proanalysis, Merk) and subsequently incubated at 90 °C for 3 hr. Finally, AgNPs were deposited onto ZnO nanowires. This step was performed by immersing Si/ZnO substrates in a 0.1 M AgNO₃ solution prepared with a 1:1 ratio ethanol–water solution and subjecting them to UV-irradiation with 254-nm excitation for 12 min. These conditions would be suitable to produce plasmonic resonance on the AgNPs with the 532-nm laser because the substrates thus obtained have demonstrated to be SERS-active with a 10^{−7} M probe solution of crystal violet (data not shown here).

2.3 | Computational details

Quantum chemical calculations were performed with the Gaussian(R) 03 Program Package.^[21] The grown state geometry of imazalil was fully optimized by using the density functional theory with the B3LYP hybrid functional^[22–24] and the standard split valence basis set 6–311 + g(2df,p). Previously, rigid potential energy surface scans were performed at the B3LYP/6-31 g(d) level of theory to estimate the starting molecular geometry for optimization. Calculations were also performed for the imazalil molecule attached to a single silver atom (imazalil-Ag complex). The *gen* keyword was used, where the light atoms (CHNOCl) were calculated with the 6–311 + g(2df,p) basis set and the Ag atoms with the LANL2DZ basis set considering a pseudo potential. In order to determine the more probable orientations of imazalil on the silver surface, different locations of the Ag atom in the molecule vicinity were probed by evaluating the energies of the optimized complexes. The subsequent vibrational calculations, performed at the same level of theory than the optimizations, allowed

to ensure that the structures were true minima (imaginary wavenumbers were not obtained) and to determine the corresponding zero-point vibrational energies (ZPVEs). The calculated vibrational frequencies were scaled by an appropriated factor (0.9723) to match better with the experimental data. The vibration modes were identified and assigned with the aid of GaussView 5.0 graphical interface^[25] that allows an interpretation of the predicted normal modes based on the atomic Cartesian displacements, reinforced by the corresponding displacement vectors.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Conformational analysis and structural characterization of imazalil

The evaluation of the most stable conformation adopted by the imazalil molecule was performed by exploring the potential energy surface as a function of three dihedral angles that were separately varied. The preferred orientations of the aromatic rings and the vinyl group, with respect to the chiral C1 atom, were predicted with the B3LYP/6–31 g(d) method. Figure 1 shows the single-point energy calculations done for different values of the dihedral angles $\phi(\text{C11–N4–C2–C1})$, $\phi(\text{C10–C3–C1–C2})$, and $\phi(\text{C22–C13–O7–C1})$ that determine the orientation of the imidazole, benzene, and vinyl groups, respectively. As was expected, flexibility around the C1–C3 bond is highly restricted due to steric interactions of the chlorine atom in *ortho* position with both CH₂ groups of the molecule. The most stable conformation is reached for the $\phi(\text{C10–C3–C1–C2}) = -90^\circ$. A second local minimum is calculated at $\phi = -120^\circ$ with an energy of 2.50 kcal.mol^{−1} above the global minimum. Similarly, the vinyl group appears also confined in a spatial region that keeps it apart from interactions with the π -electrons systems of both aromatic rings. In this scan, the zero energy value corresponds to a minimum occurring at $\phi(\text{C22–C13–O7–C1}) = 180^\circ$, which is centered in a wide trough with higher energies by 1.3, 0.45, and 1.85 kcal.mol^{−1} calculated for ϕ values of 150°, 210°, and 240°, respectively. In turn, the orientation of the imidazole-ring plane shows two minima at $\phi(\text{C11–N4–C2–C1}) = \pm 90^\circ$, and with an energy difference between them of only 0.27 kcal.mol^{−1}. In this case, the second minimum is separated from the first by an internal energy barrier of 4.31 kcal.mol^{−1}.

Figure 2 shows the fully optimized molecular geometry of the most stable conformer, as derived from the three global minima obtained. In the preferred arrangement, both aromatic rings planes are parallel to each other, whereas the allyl group attached to the O atom adopts such orientation that any steric and/or electronic

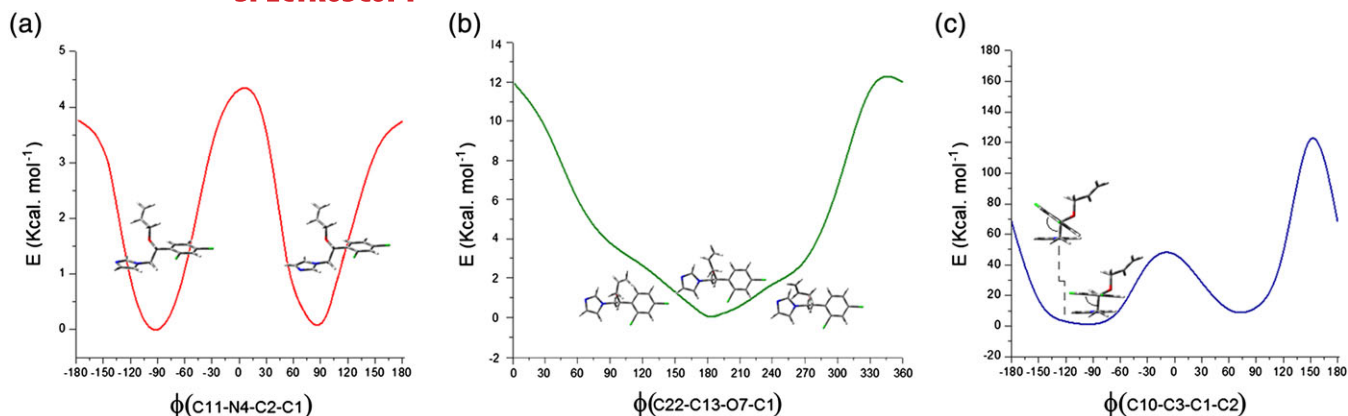


FIGURE 1 Rigid potential energy surface scans were performed at the B3LYP/6-31 g(d) level of theory. Three different coordinates were modified independently. In (a) and (c), the dihedral angles $\phi(\text{C11-N4-C2-C1})$ and $\phi(\text{C10-C3-C1-C2})$, respectively, were varied from -180° to 180° . In (b), the dihedral angle $\phi(\text{C22-C13-O7-C1})$ was varied from 0° to 360° . The step size for each variable was 30° . For atom numbering see Figure 2 [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

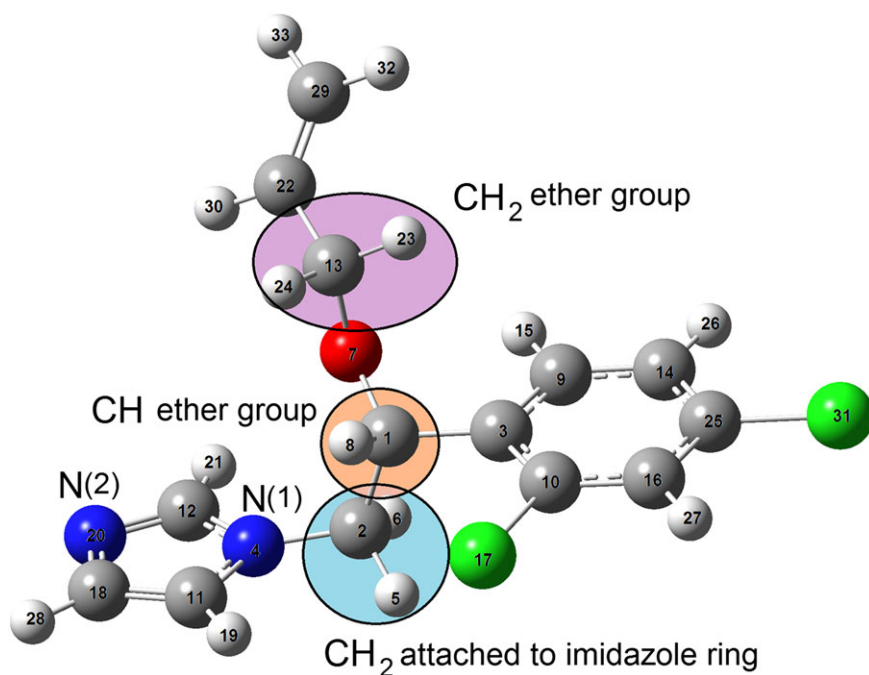


FIGURE 2 Optimized molecular structure of imazalil at the B3lyp/6-311 + g(2df,p) level of theory. Nitrogen atoms are renumbered as N(1) and N(2) and the methylene and methine groups with C_{sp^3} are marked and renamed as CH_2 ether, CH ether, and CH_2 attached imidazole ring as they are referred in the assignment tables [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

interaction with the π electrons of the imidazol or benzene rings is minimized. The geometrical parameters, calculated with the B3LYP/6-311 + g(2df,p) method, are presented in Table 1.

3.2 | Vibrational characterization of imazalil

The experimental FTIR and normal Raman spectra in the $3,200\text{--}500$ and $3,200\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ ranges, respectively, of imazalil as pure substance and as the commercial concentrate pesticide, are shown in Figure 3. Calculated IR and Raman spectra for the isolated imazalil molecule,

performed with the B3LYP/6-311 + g(2df,p) method, are also included in Figure 3.

According to published vibrational analysis for related molecular systems, most of the bands appearing between $1,700$ and $1,450\text{ cm}^{-1}$ are due to $\text{C}=\text{C}$ and $\text{C}=\text{N}$ stretchings of the vinyl group and the imidazole and benzene rings; several CH_2 deformations and in-plane-ring vibration modes of $\text{C}_{sp^2}\text{-H}$, CCC, and CNC atomic groups are observed between $1,460$ and $1,100\text{ cm}^{-1}$, and the bands below $1,000\text{ cm}^{-1}$ are associated mainly with torsions and out-of-plane ring deformations; complex vibrations involving the C-O and C-Cl bonds appear in the $1,100\text{--}1,000\text{ cm}^{-1}$ range. A more detailed band

TABLE 1 The optimized geometrical parameters of imazalil, calculated at the B3LYP/6311 + g(2df,p) level of theory

Bond length (Å)		Bond angle (°)		Dihedral angle (°)	
C1–C2	1.538	C1C3C10	122.86	C1C3C10C16	178.81
C1–C3	1.522	C2C1C3	110.44	C2C1C3C10	–85.21
C1–O7	1.412	N4C2C1	113.15	N4C2C1C3	171.37
C2–N4	1.449	C9C3C10	117.01	C9C3C10C16	0.35
N4–C11	1.380	C11N4C2	126.52	C11N4C2C1	–84.50
N4–C12	1.364	C12N4C2	127.02	C12N4C2C1	91.40
C11–C18	1.367	C14C9C3	122.02	C14C9C3C10	–0.20
C18–N20	1.374	C18C11N4	105.74	C18C11N4C2	176.92
N20–C12	1.311	N20C12N4	112.19	N20C12N4C2	–177.00
C3–C9	1.395	O7C1C3	112.23	O7C1C3C10	155.74
C3–C10	1.395	C13O7C1	114.78	C13O7C1C3	–82.36
C9–C14	1.387	C22C13O7	108.64	C22C13O7C1	–174.42
C14–C25	1.388	C29C22C13	124.11	C29C22C13O7	–126.94
C25–C16	1.386	C25C16C10	118.74	C25C16C10C3	–0.26
C10–C16	1.389	Cl17C10C16	117.21	Cl17C10C16C25	179.63
C10–Cl17	1.756	Cl31C25C16	119.21	Cl31C25C16C10	179.92
C25–Cl31	1.745				
O7–C13	1.429				
C13–C22	1.494				
C22–C29	1.326				

assignment of the experimentally observed features was achieved based on the theoretical prediction of the vibrational behavior of the imazalil molecule. Only the most representative bands are discussed here, but the complete vibrational assignment for most of the FTIR and Raman bands is presented in Table 2.

The $\nu\text{C}=\text{C}$ mode of the vinyl group is assigned to the intense band observed at $1,641\text{ cm}^{-1}$ in the Raman spectrum of the pure substance ($1,635\text{ cm}^{-1}$, weak feature in FTIR), in agreement with reported data for vinyl group in ethers and olefins.^[26–28] The $\nu\text{C}=\text{C}$ vibrations of substituted benzene rings are well characterized in bibliography.^[27,29–31] Thus, the Raman bands observed at $1,590$, $1,561$ and $1,459\text{ cm}^{-1}$ are straightforward assigned to typical stretching modes of the benzene ring, showing good concordance with the theoretical predictions as well with the features observed in the spectra of the concentrate for agricultural uses. The intensity of the last band ($1,459\text{ cm}^{-1}$) in the Raman of the commercial pesticide suggests the presence of impurities/excipients contributing to the band shape. In this spectral region are also expected stretching vibrations localized in the imidazole ring: two medium-intensity Raman bands centered at $1,528$ and $1,512\text{ cm}^{-1}$ have been published for methyl imidazole and at $1,535$ and $1,488\text{ cm}^{-1}$ for imidazole in

neutral state, which have been briefly reported as ring vibrations,^[32,33] and a medium-intensity band at $1,504\text{ cm}^{-1}$ has been observed in an N-substituted imidazole product and attributed to the stretching of the single C–N bond.^[34] According to our calculations for the imazalil molecule, these vibrations can be characterized as the out-of-phase stretching of the $\text{C}=\text{C}$ and $\text{C}=\text{N}_{(2)}$ bonds ($\nu_{\text{o.o.ph}}\text{C}=\text{C}/\text{C}=\text{N}_{(2)}$) and the symmetric stretching $\nu_{\text{s}}\text{CN}_{(1)}\text{C}$, which are predicted at $1,496$ and $1,484\text{ cm}^{-1}$ and would be observed as the intense FTIR features at $1,502$ and $1,469\text{ cm}^{-1}$, respectively. This last band, not observed in the Raman spectra of imazalil, could be also attributed to a deformation mode of the CH_2 ether group, calculated at $1,464\text{ cm}^{-1}$ (see Table 2).

Two strong Raman bands centered at $1,363$ and $1,346\text{ cm}^{-1}$ are observed in the spectrum of the pure substance, whereas in the commercial concentrate, a single intense albeit asymmetric band is observed; their FTIR counterparts are manifested as weak signals. According to the theoretical predictions, these features are associated to CH_2 and COC deformations as well as to the $\nu_{\text{i.ph}}\text{C}=\text{C}/\text{C}=\text{N}_{(2)}$ mode.

In general, the $\nu\text{C}-\text{Cl}$ modes in molecules with the halogen attached directly to a benzene ring are strongly coupled with different δCCC and δCH rings

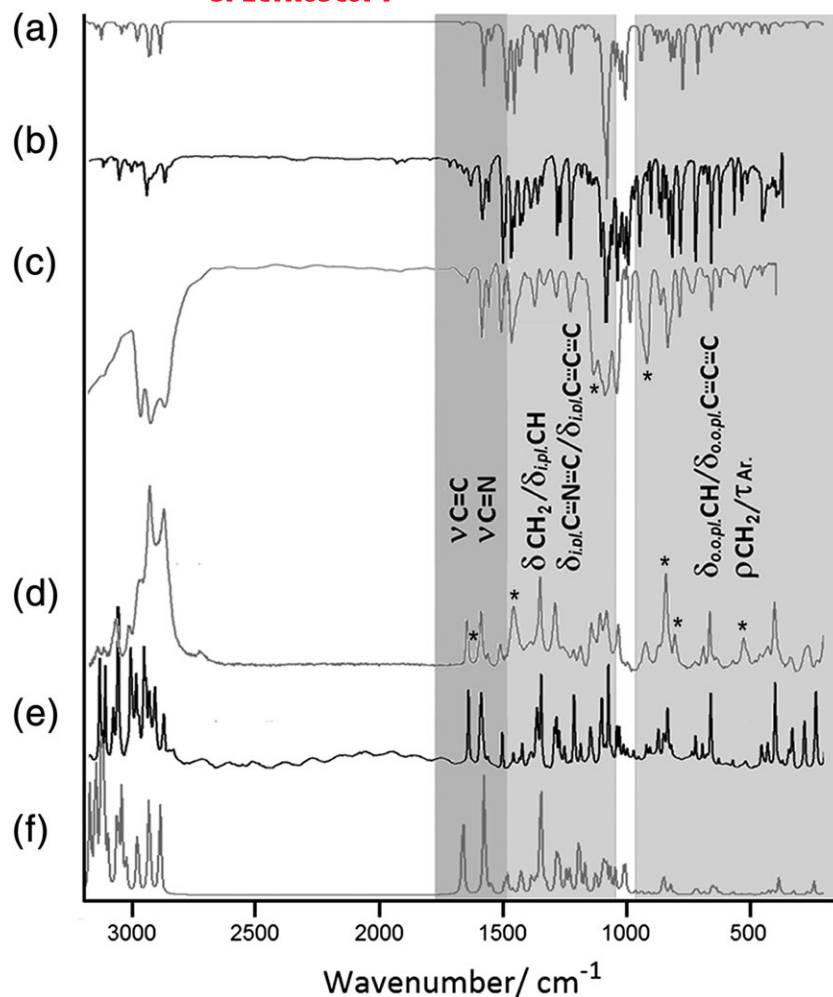


FIGURE 3 Experimental and calculated IR and Raman spectra for imazalil. (a,f) Theoretical IR and Raman spectra, respectively, predicted with the (B3LYP/6-311 + g (2df,p)) method. (b) FTIR spectrum of the pure imazalil supported in a KBr pellet. (c) FTIR spectrum of the agricultural commercial product acquired from a film supported between KRS-5 windows. (d) Raman spectrum of a 10- μ l drop of the agricultural commercial product deposited on a gold glass slide. (e) Raman spectrum of the pure substance, obtained directly from the solid deposited on a gold glass slide. The commercial product was used without purification. All spectra were acquired at ambient temperature. *Bands showing high contributions from the impurities and/or excipients in the emulsifiable concentrated. Ar. = aromatic ring.

vibrations.^[30,31] Our calculations predict additional couplings between the modes involving the halogen atoms with the asymmetric C–O–C stretching and other C–C vibrations, making a difficult unequivocal assignment. Thus, based on reported values for different chlorine-substituted benzene rings, the strongest FTIR bands at 1,087, 1,072, 1,041, and 1,030 cm^{-1} are tentatively associated with complex vibrations involving the C–Cl stretchings with the ν_{as} C–O–C, ρCH_2 , and one $\delta_{\text{i.pl.}}\text{CCC}$ modes. In the Raman spectrum of the pure imazalil, these fundamentals are observed as a very strong band at 1,074 cm^{-1} and two medium intensity bands at 1,041 and 1,030 cm^{-1} .

Most of the C–H and CCC out-of-plane deformations of both aromatic rings are predicted as mixed vibrations, appearing below 900 cm^{-1} . A tentative assignment of the experimental bands to these modes is proposed (Table 2).

The overall good correlation existing between the calculated wavenumbers and the bands observed in the spectra of the pure substance facilitates the identification of bands that could receive contributions from vibrational modes belonging to the impurities and/or excipients

present in the emulsifiable product. This is the case for the bands observed at 1,459, 840, 804, and 524 cm^{-1} in the Raman spectrum of this commercial sample, whose intensities differ considerably from the corresponding bands in the spectrum of the pure imazalil. The same interpretation is proposed for the intense bands observed at 1,138 and 922 cm^{-1} in the FTIR spectrum of the commercial agricultural product.

3.3 | SERS spectra of imazalil on Si/ZnO/AgNP substrate

The SERS spectrum of $\sim 10^{-5}$ M aqueous solution of imazalil was measured. The spectral range between 1,700 and 500 cm^{-1} is presented in Figure 4. For comparison, the normal Raman spectrum of the pure imazalil and that of the clean substrate are included in the figure; also, a SEM image of the substrate is presented.

The Raman of the Si/ZnO/AgNP substrate shows a very strong and sharp band at 521 cm^{-1} , which is characteristic of the crystalline silicon, and a weak and flat band spanning from 940 to 980 cm^{-1} , typical of the SiO as thin film.^[35] The SiO film is probably formed on the crystalline

TABLE 2 Calculated and experimental wavenumbers together with a tentative assignment for imazalil as pure substance and as emulsifiable concentrate pesticide

Imazalil (pure)		B3LYP/6-311 + g(2df,p) ^b (cm ⁻¹)	Emulsifiable concentrate		Assignment ^c
Raman ^a (cm ⁻¹)	FTIR ^a (cm ⁻¹)		Raman ^a (cm ⁻¹)	FTIR ^a (cm ⁻¹)	
3,172 (vw)		3,171,3,152			
3,135 (s)		3,144	3,147 (w)	3,149 (vw)	ν C-H imidazole ring
3,124 (w)	3,124 (vw)	3,123	3,121 (w)	3,111 (w)	ν_{as} = CH ₂ vinyl group
3,114 (s)	3,112 (vw)	3,114		3,084 (w)	ν C-H benzene ring
3,080 (m)	3,080 (vw)	3,098			
3,061 (vs)	3,059 (m)	3,059 3,043	3,071 (m)		ν C-H vinyl group ν_s =CH ₂ vinyl group
3,010 (s)	3,009 (m)	3,024	3,016 (m)	ν_{as} CH ₂ attach. imidazole ring	
2,988 (s)	2,988 (w)	2,978	2,970 (s, br)	2,968 (s)	ν_s CH ₂ attach. imidazole ring
2,955 (s)	2,947 (m)	2,933			ν_{as} CH ₂ ether + C-H ether
2,934 (m)	2,933 (w)	2,929	2,934 (vs)	2,928 (s)	ν_{as} CH ₂ ether-C-H ether
2,875 (m)	2,875 (m)	2,888	2,877 (vs)	2,871 (s)	ν_s CH ₂ ether
1,641 (s)	1,635 (w)	1,664	1,646 (s)	1,647 (w)	ν C=C vinyl group
			~1,600 (sh) ^d		
1,590 (s)	1,589 (s)	1,578	1,589 (s)	1,589 (s)	ν C=C benzene ring
1,561 (w)	1,561 (m)	1,549	1,561 (m)	1,561 (w)	ν C=C benzene ring
1,504 (m)	1,502 (s)	1,496 1,484	1,511 (m)	1,511 (s)	$\nu_{o.o.ph.}$ C=C/C=N ₍₂₎ imidazole ring ν_s CN ₍₁₎ C imidazole ring
1,459 (w)	1,469 (s)	1,464	1,459 (s,br) ^d	1,469 (s)	δ CH ₂ ether
1,435 (w)	1,459 (m)	1,457		1,460 (sh)	ν C=C benzene ring
	1,434 (m)	1,433		1,440 (sh)	δ CH ₂ imidazole ring
1,423 (m)	1,423 (m)	1,426	1,426 (sh)		δ CH ₂ vinyl group
1,387 (w)	1,391 (m)	1,386 1,371	1,387 (w,br)	1,375 (m)	δ CH ν_{as} CN ₍₁₎ C imidazole ring
1,363 (s)	1,363 (m)	1,367	1,349 (s)		δ CH ₂ + δ COC
1,346 (s)	1,346 (w)	1,350 1,346		1,346 (sh) 1,338 (w)	Wag. CH ₂ attach. imidazole ring $\nu_{i.ph.}$ C=C/C=N ₍₂₎ imidazole ring
1,320 (vvw)		1,329			δ CH ₂ attach. imidazole ring
1,293 (m)		1,289	1,289 (s)	1,289 (m)	δ CH
1,285 (m)	1,285 (m)	1,283			δ CH vinyl group
1,274 (m)	1,274 (m)	1,276			$\delta_{i.pl.}$ CH imidazole ring + $\delta_{i.pl.}$ CN ₍₁₎ C
1,252 (m)		1,255 1,245	1,257 (w,br)		$\delta_{i.pl.}$ CCC benzene ring $\delta_{i.pl.}$ CH benzene ring
1,233 (vw)	1,230 (s)	1,233			τ CH ₂
1,216 (s)	~1,214 (sh)	1,228		1,232 (m)	$\delta_{i.pl.}$ CH imidazole ring
1,186 (m)	1,186 (w)	1,195	1,184 (m)	1,184 (w)	τ CH ₂ imidazole ring + ν C _{sp3} -C _{sp2} benzene ring
1,147 (m)	1,144 (vw)	1,170	1,141 (s)	1,138 (vs) ^d	ν C _{sp3} -C _{sp2} benzene ring + $\delta_{i.pl.}$ CH benzene ring
1,107 (m)	1,107 (s)	1,104	1,106 (s)	1,106 (vs)	$\delta_{i.pl.}$ CH imidazole ring + $\delta_{i.pl.}$ CN ₍₂₎ C
1,087 (w)	1,087 (vs)	1,093		1,092 (vs)	ν_{as} C-O-C + $\nu_{i.ph.}$ C-Cl
1,074 (vs)	1,072 (m)	1,082	1,080 (s)	1,080 (sh)	ν_{as} C-O-C + $\nu_{i.ph.}$ C-Cl

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

Imazalil (pure)		B3LYP/6-311 + g(2df,p) ^b (cm ⁻¹)	Emulsifiable concentrate		Assignment ^c
Raman ^a (cm ⁻¹)	FTIR ^a (cm ⁻¹)		Raman ^a (cm ⁻¹)	FTIR ^a (cm ⁻¹)	
1,062 (w)	1,061 (m)	1,068	,		$\delta_{i.pl.}$ CH imidazole ring
1,041 (m)	1,041 (s)	1,048		1,046 (vs)	$\nu_{o.o.ph.}$ C-Cl + ρ CH ₂ attach. imidazole ring
1,030 (m)	1,030 (m)	103	1,033 (s)		ν C-Cl + $\delta_{i.pl.}$ CCC benzene ring
1,013 (w)	1,013 (m)	1,015 1,008	1,010 (vw)	1,010 (w)	$\delta_{i.pl.}$ CN ₍₁₎ C imidazole ring ν_s C-O-C
998 (w)	997 (m)	1,005	995 (w)	992 (m)	$\delta_{o.o.pl.}$ CH vinyl group
955 (w)	952 (m)	943		947 (sh)	Wag=CH ₂ vinyl group
920 (w)	921 (vw)	915	922 (m)	922 (s) ^d	$\delta_{i.pl.}$ CH vinyl group
907 (w)	905 (w)	892			$\delta_{i.pl.}$ CN ₍₂₎ C imidazole ring
872 (m)	871 (w) 863 (w)	878 860	866 (m)	866 (m)	$\delta_{o.o.pl.}$ CH benzene ring ρ CH ₂ attach. imidazole ring + ν C _{sp3} -C _{sp3}
850 (m)	847 (w)	853	840 (s) ^d	840 (s)	$\delta_{o.o.pl.}$ CH imidazole ring
835 (s)	834 (m)	848			$\delta_{o.o.pl.}$ CH benzene ring + $\delta_{o.o.pl.}$ CH imidazole ring
820 (w)	818 (m)	825			$\delta_{o.o.pl.}$ CH benzene ring
		802	804 (m) ^d		$\delta_{o.o.pl.}$ CH imidazole ring
724 (m)	787 (m) 724 (s)	775 724		790 (m)	ν C-Cl + δ C _{sp2} -C _{sp3} -C _{sp3} $\delta_{o.o.pl.}$ CCC benzene ring
696 (m)	694 (w)	689	688 (m)	688 (w, sh)	$\delta_{i.pl.}$ CCC benzene ring + $\delta_{i.pl.}$ CNC imidazole ring
662 (vs)	662 (s)	659	660 (s)	660 (m)	τ imidazole ring
630 (w)	625 (m)	623	629 (w)	629 (w)	τ imidazole ring
523 (w)		507	524 (m) ^d	523 (m)	Skeletal
456 (m)	450 (m)	456			$\delta_{o.o.pl.}$ CCC benzene ring
433 (m)		431			$\delta_{o.o.pl.}$ CCC benzene ring
402 (vs)		388	398 (s)		$\delta_{o.o.pl.}$ CCC benzene ring
282 (vs)		272			Skeletal
238 (vs)		246	263 (m)		Wag. imidazole ring
193 (vs)		188	195 (s)		δ_s ClCC

^as, Strong; vs, very strong; m, medium; w, weak; vw, very weak; sh, shoulder; br, broad.

^bAll the wavenumbers were scaled by 0.9723.

^c ν , Stretch; δ , deformation; ρ , rocking; τ , torsion; wag, wagging; s, symmetric; as, antisymmetric; i.pl., in-plane; o.o.pl., out-of-plane; i.ph., in-phase; o.o.ph., out-of-phase.

^dDenotes bands that receive contributions from vibrations associated to impurities and/or excipients present in the commercial product for agriculture.

Si wafer by surface oxidation during the manufacturing process of the SERS-substrates.

The SERS spectrum of imazalil shows several bands that correlate well with the normal Raman spectrum of the pure substance. However, to support the interpretation of the observed bands, geometry optimizations and vibrational predictions of various imazalil-Ag complexes

(B3LYP/6-311 + g(2df,p)/LANL2DZ) were performed. Figure 5 shows those imazalil-Ag complexes optimized at the lowest ZPVE values, which demonstrated to be true minima because no imaginary wavenumbers were obtained. By comparison among the corresponding energy values, it can be concluded that the imazalil molecule interacts with the metal through the

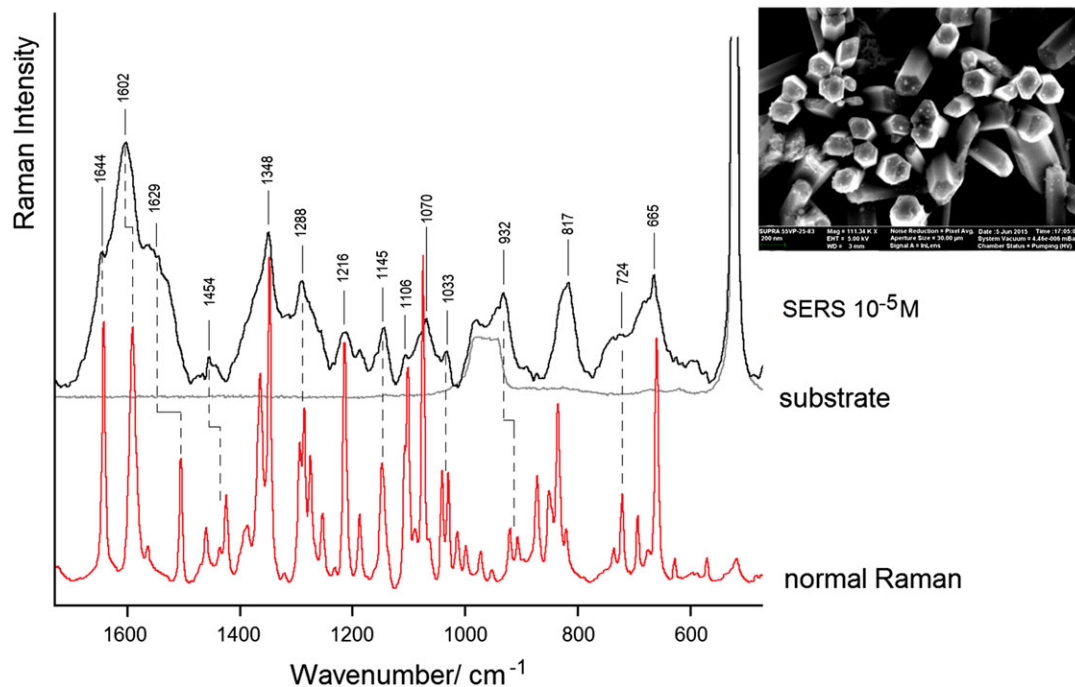


FIGURE 4 SERS spectrum between 1,700 and 500 cm^{-1} of a $\sim 10^{-5}$ M aqueous solution of imazalil (black line). The normal Raman spectrum of imazalil as pure substance (red line) and the Raman spectrum of the Si/ZnO/AgNPs substrate (grey line) are included for comparison. In set: SEM image of the Si/ZnO/AgNPs substrate [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

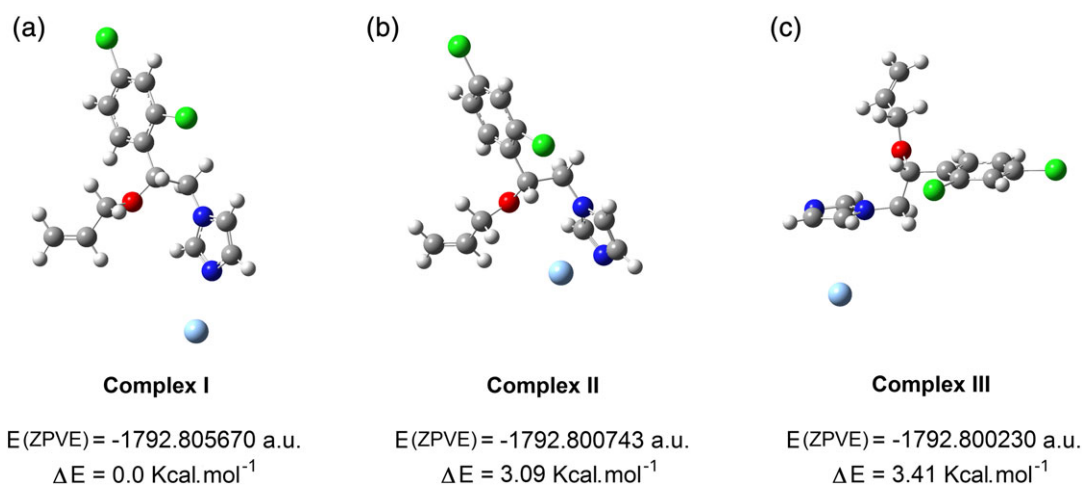


FIGURE 5 Optimized conformations of the three most stable imazalil-Ag complexes. Calculations were performed with the B3lyp/6-311 + g(2df,p) method for H, C, N, and O atoms and with the LANL2DZ basis set for Ag atom. Zero-point corrected energies (ZPVE) in Hartree and the energy differences (ΔE) in kcal.mol^{-1} with respect to the lowest ZPVE value are included [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

imidazole ring moiety, whereas interactions through the π -electrons system of the benzene ring can be ruled out due to the significantly high energies (data not shown).

Previous studies of imidazole by SERS have shown that this molecule can adsorb onto a metal surface in two different ways: through the unshared pair of electrons

on the $\text{N}_{(2)}$ atom or through the π -electrons system of the imidazole ring.^[36] Coordination through the $\text{N}_{(2)}$ atom leads the molecule to adopt a perpendicular orientation of the aromatic ring plane with respect to the metal surface,^[36] as was also observed for other heteroaromatic rings.^[37–39] In the case of imazalil, this type of coordination implies that the vinyl group may also interact with

the metal through the π electrons of the C=C double bond. In effect, the imazalil-Ag complex showing the lowest ZPVE value is that with the metal interacting with the N₍₂₎ atom but, due to the proximity of the vinyl group, the optimization converged leaving the silver atom in a position slightly deviated from the coplanarity with the imidazole group (see Complex I in Figure 5). Other possible arrangements show the metal atom interacting with the

π -electrons system of the imidazole on both ring faces. Complexes II and III present $\Delta E = 3.09 \text{ kcal.mol}^{-1}$ and $\Delta E = 3.41 \text{ kcal.mol}^{-1}$ relative to Complex I, respectively.

Table 3 lists the SERS bands shown in Figure 4 together with the corresponding wavenumbers predicted for the most probable imazalil-Ag complex. According to the observed and calculated features, it is proposed that the band originated by the $\nu_{\text{o.o.ph}} \text{C}=\text{C}/\text{C}=\text{N}_{(2)}$ mode

TABLE 3 SERS bands observed in the 1,700–500 cm^{-1} spectral range of 10^{-5} M aqueous solutions of imazalil as pure substance and as commercial pesticide for agricultural uses

SERS pure Imazalil (cm^{-1})	SERS commercial pesticide (cm^{-1})	Complex I B3LYP/6-311 + g(2df,p)/LANL2DZ ^{a,b} (cm^{-1})	Assignment ^c
1,644		1,664	$\nu \text{C}=\text{C}$ vinyl group
1,602	1,601	1,577	$\nu \text{C}=\text{C}$ benzene ring/ H_2O /impurity
1,564		1,548	$\nu \text{C}=\text{C}$ benzene ring
1,547/1,529		1,501 (+5) 1,492 (+8)	$\nu_{\text{o.o.ph.}} \text{C}=\text{C}/\text{C}=\text{N}_{(2)}$ imidazole ring $\nu_{\text{s}} \text{CN}_{(1)}\text{C}$ imidazole ring
1,454	1,450	1,466	$\nu \text{C}=\text{C}$ benzene ring/impurity/excipient
1,348	1,352	1,346 (−4) 1,345	Wag. CH_2 attach. imidazole ring $\nu_{\text{i.ph.}} \text{C}=\text{C}/\text{C}=\text{N}_{(2)}$ imidazole ring
1,288	1,300	1,288 1,282	δ CH δ CH vinyl group
1,270		1,277	$\delta_{\text{i.pl.}} \text{CH}$ imidazole ring + $\delta_{\text{i.pl.}} \text{CN}_{(1)}\text{C}$
1,256		1,254 1,245	$\delta_{\text{i.pl.}} \text{CCC}$ benzene ring $\delta_{\text{i.pl.}} \text{CH}$ benzene ring
1,216		1,229	$\delta_{\text{i.pl.}} \text{CH}$ imidazole ring
1,188		1,198	τCH_2 imidazole ring + $\nu \text{C}_{\text{sp}3}-\text{C}_{\text{sp}2}$ benzene ring
1,145	1,152	1,170	$\nu \text{C}_{\text{sp}3}-\text{C}_{\text{sp}2}$ benzene ring + $\delta_{\text{i.pl.}} \text{CH}$ benzene ring
1,106		1,101 (−3)	$\delta_{\text{i.pl.}} \text{CH}$ imidazole ring + $\delta_{\text{i.pl.}} \text{CN}_{(2)}\text{C}$
1,070	1,063	1,081 1,073 (+5)	$\nu_{\text{as}} \text{C}-\text{O}-\text{C}$ + $\nu_{\text{i.ph.}} \text{C}-\text{Cl}$ $\delta_{\text{i.pl.}} \text{CH}$ imidazole ring
1,033	1,030	1,050 1,016	ρCH_2 attach. imidazole ring $\delta_{\text{i.pl.}} \text{CN}_{(1)}\text{C}$ imidazole ring
	1,000		Impurity/excipient
932		915 904 (+12)	$\delta_{\text{i.pl.}} \text{CH}$ vinyl group $\delta_{\text{i.pl.}} \text{CN}_{(2)}\text{C}$ imidazole ring
	894		Impurity/excipient
	874		Impurity/excipient
817	822	849 817 (+15)	$\delta_{\text{o.o.pl.}} \text{CH}$ benzene ring / imidazole ring $\delta_{\text{o.o.pl.}} \text{CH}$ benzene ring
724		725	$\delta_{\text{o.o.pl.}} \text{CCC}$ benzene ring
674		688	$\delta_{\text{i.pl.}} \text{CCC}$ benzene ring + $\delta_{\text{i.pl.}} \text{CNC}$ imidazole ring
665		654	τ imidazole ring

^aAll the wavenumbers were scaled by 0.9723.

^bData in parentheses are the difference between calculated wavenumbers for Complex I and imazalil molecule.

^c ν , Stretch; δ , deformation; ρ , rocking; τ , torsion; wag, wagging; s, symmetric; as, antisymmetric; i.pl., in-plane; o.o.pl., out-of-plane; i.ph., in-phase; o.o.ph., out-of-phase.

experiences an important upshift upon SERS effect (from 1,504 to 1,529 or 1,547 cm^{-1}), and the irregular band contour on the low wavenumber side indicates that the $\nu_s \text{CN}_{(1)}\text{C}$ mode becomes more active. These interpretations are in concordance with the expected interaction of the imazalil molecule with the metal surface: The corresponding wavenumbers for both vibrations in Complex I are predicted experiencing blueshifts. Similarly, the $\delta_{i.pl.} \text{CN}_{(2)}\text{C}$ mode (observed at 907 cm^{-1} in the normal Raman spectrum of the pure substance) can be associated with the SERS band at 932 cm^{-1} . The strong SERS band at 1,602 cm^{-1} could be assigned to the benzene $\nu\text{C}=\text{C}$ mode (the strong band at 1,590 cm^{-1} in the normal Raman spectrum). However, interactions of the benzene ring with the metal are not predicted to justify a shift of this band. Alternatively, this intense band may be related to the presence of water molecules in interaction with the metal surface, according to reported SERS spectra of pure water that showed a band^[39,40] at 1,610 cm^{-1} .

The presence of SERS bands corresponding to both the in-plane and out-of-plane vibration modes of the imidazole and benzene aromatic rings suggests that imidazol adopts a tilted orientation with respect to the metal

surface.^[41,42] However, the possibility that the molecule is also adsorbed on the metallic surface with a flat orientation of the imidazole ring is not ruled out.

3.4 | SERS spectra of the imazalil product for agricultural uses

Figure 6 compares the SERS spectra, in the region of 1,700 to 600 cm^{-1} , of the aqueous solutions of imazalil (10^{-5} M) as product for agricultural use and as pure substance. In general, the SERS spectral profile of the commercial pesticide evidences several bands that correlate well with those observed in the SERS spectrum of the pure imazalil, but exhibiting weaker intensities. The SERS bands of the commercial sample are included in Table 3.

In the spectrum of the commercial pesticide, the band centered at 1,450 cm^{-1} stands out. Due to its intensity and band shape, this feature is associated with vibrations corresponding to impurity and/or excipient present in the sample. The sharp band observed at 1,000 cm^{-1} as well as those at 894 and 874 cm^{-1} would also be attributable to the presence of impurities.

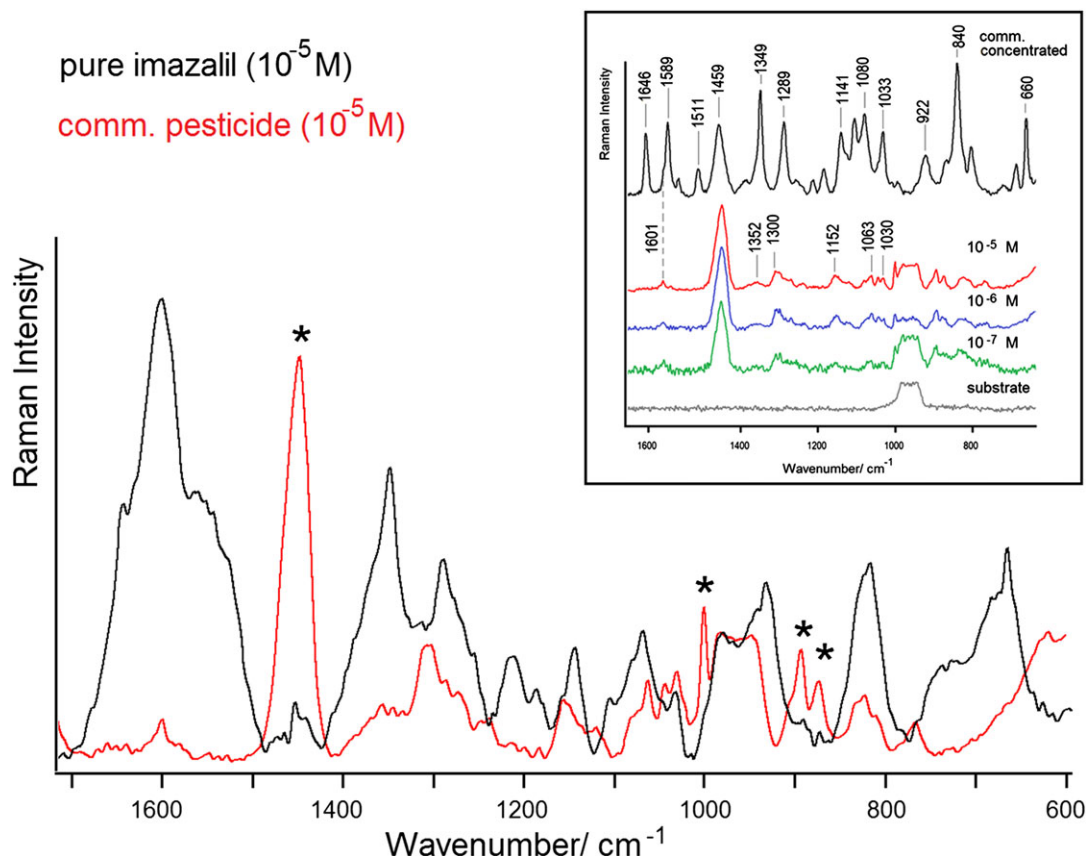


FIGURE 6 SERS spectra in the 1,700 and 600 cm^{-1} range of aqueous solutions of imazalil (10^{-5} M) as a pesticide for agricultural use (red line) and as a pure substance (black line). In set: Series of SERS spectra of aqueous solutions of the commercial pesticide at different concentrations: 10^{-5} M, 10^{-6} M, and 10^{-7} M, together with the normal Raman spectrum of imazalil as commercial concentrate and the Raman spectrum of the Si/ZNO/AgNPs substrate [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

4 | CONCLUSIONS

The complete vibrational analysis of imazalil as pure substance in solid state and as a commercial pesticide product is presented here. Quantum chemical calculations allowed a reliable assignment of most of the observed IR and Raman bands. This study constitutes the starting point for the implementation of SERS as a trace detection method for imazalil as contaminant in fruits and foods.

Although the strongest band in the SERS spectra of the commercial agricultural product ($1,450\text{ cm}^{-1}$) is interpreted as receiving remarkable contributions from vibrations of impurities or excipients in the sample, the detection of other several features, albeit weak, offers a promising prospect for the use of the Si/ZnO/AgNPs-based substrates for determinations of the contaminant imazalil by SERS.

Interpretation of the SERS spectrum of the pure substance relies on computational predictions of the main binding sites of a silver atom to the different functional groups of the imazalil molecule. Correlation between the vibrational behavior predicted for the imazalil-Ag complex with the lowest ZPVE value with the experimentally observed features allowed proposing the most probable adsorption orientation. These results are important for subsequent uses of the novel Si/ZnO/AgNP-based substrate for fast, low-cost, and sensitive detection of this contaminant.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by CONICET, Universidad Nacional de Tucumán, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) Grant PICT2012 N299 to R. M. S. A. M. A. S. is grateful to CONICET for a Doctoral Fellowship. D. M. C. is a scientific support personnel of CONICET. R. M. S. A. is a career researcher of CONICET.

The authors would like to thank Citricola San Miguel S. A. for providing the pesticide product. Special thanks are extended to Dr. Roxana Madrid and Dr. David Comedi for their generosity to facilitate installations and equipment for the substrate building. All authors read and approved the final article.

ORCID

Rosa M.S. Álvarez  <http://orcid.org/0000-0002-5468-0705>

REFERENCES

- [1] M. F. Franco-Bernardes, M. Pazin, L. C. Pereira, D. J. Dorta, *Toxicology Studies—Cells, Drugs Environment*, InTech, Croatia **2015** 195.
- [2] C. C. Leandro, P. Hancock, R. J. Fussell, B. J. Keely, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1103*, 94.
- [3] J. Fillion, F. Sauvé, J. Selwyn, *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 698.
- [4] S. R. Ananda Gowda, R. K. Somashekar, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2012**, *89*, 626.
- [5] S. Grimalt, P. Dehouck, *J. Chromatogr. A* **2016**, *1433*, 1.
- [6] S. Pang, T. Yang, L. He, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, *85*, 73.
- [7] L. Yande, Z. Yuxiang, W. Haiyang, Y. Bing, *Int. J. Agric. Biol. Eng.* **2016**, *9*, 179.
- [8] A. Kim, S. J. Barcelo, Z. Li, *Nanotechnology* **2015**, *26*, 15502.
- [9] B. Wang, L. Zhang, X. Zhou, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *121*, 63.
- [10] C. Müller, L. David, V. Chis, S. C. Cinta, *Food Chem.* **2014**, *145*, 814.
- [11] J. C. S. Costa, R. A. Ando, A. Sant'Ana, P. Corio, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15645.
- [12] M. Fleischmann, P. Hendra, A. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163.
- [13] M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* **1985**, *57*, 783.
- [14] M. Fan, G. F. S. Andrade, A. G. Brolo, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *693*, 7.
- [15] D. Ortelli, E. Patrick, C. Corvi, *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 423.
- [16] M. R. Siegel, N. N. Ragsdale, *Pestic. Biochem. Physiol.* **1978**, *9*, 48.
- [17] E. Le Ru, S. Meyer, C. Artur, P. Etchegoin, J. Grand, P. Lang, F. Maurel, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3903.
- [18] J. Cabalo, J. A. Guicheteau, S. Christesen, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 9028.
- [19] L. E. Greene, M. Law, D. H. Tan, M. Montano, J. Goldberger, G. Somorjai, P. Yang, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1231.
- [20] L. E. Greene, B. D. Yuhas, M. Law, D. Zitoun, P. Yang, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 7535.
- [21] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, *Revision E.01, Gaussian, Inc.*, Wallingford CT **2003**.
- [22] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*.
- [23] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*.
- [24] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623.

- [25] R. Dennington II, T. Keith, J. Millam, K. Eppinnett, W. L. Hovell, R. Gilliland, *GaussView version 4.1*, Semichem, Shawnee Mission, KS, USA **2003**.
- [26] H. Kimmel, W. H. Snyder, *Spectrosc. Lett.* **1971**, *4*, 15.
- [27] N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd ed., Academic Press, New York **1990**.
- [28] D. W. Mayo, F. A. Miller, and R. W. Hannah, *Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra*, Wiley, New York **2004**, 73.
- [29] R. M. S. Alvarez, R. N. Fariás, P. Hildebrandt, *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35*, 947.
- [30] X. Xuan, C. Zhai, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, *79*, 1663.
- [31] M. Govindarajan, M. Karabacak, V. Udayakumar, S. Periandy, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *88*, 37.
- [32] D. A. Carter, J. E. Pemberton, *J. Raman Spectrosc.* **1997**, *28*, 939.
- [33] J. Bukowska, A. Kudelski, K. Jackowska, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *309*, 251.
- [34] V. Calvino-Casilda, M. A. Bañares, *Catal. Today* **2012**, *187*, 191.
- [35] P. Borowicz, M. Latek, W. Rzodkiewicz, A. Łaszcz, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 45003.
- [36] B. H. Loo, Y. Tse, K. Parsons, C. Adelman, Y. G. Lee, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 299.
- [37] M. Muniz-Miranda, M. Pagliai, F. Muniz-Miranda, V. Schettino, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3138.
- [38] L. Chen, Y. Gao, H. Xu, Z. Wang, Z. Li, R. Zhang, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 20665.
- [39] Y. Chen, A. Otto, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 736.
- [40] J. Li, Y. Huang, S. Duan, R. Pang, D. Wu, B. Ren, X. Xu, Z. Tian, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 2493.
- [41] A. Mühlig, D. Cialla-May, J. Popp, *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 2323.
- [42] D. V. Chulhai, L. Jensen, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 19622.

How to cite this article: Díaz-Mirón G, Sánchez MA, Chemes DM, Álvarez RMS. SERS spectrum of imazalil. Experimental and quantum-chemical vibrational analysis. *J Raman Spectrosc.* 2017;1–13. <https://doi.org/10.1002/jrs.5321>

Accepted Manuscript

Title: Potentiometric textile-based pH sensor

Author: M.L. Zamora J.M. Dominguez R.M. Trujillo C.B.
Goy M.A. Sanchez R.E. Madrid



PII: S0925-4005(18)30002-9
DOI: <https://doi.org/doi:10.1016/j.snb.2018.01.002>
Reference: SNB 23899

To appear in: *Sensors and Actuators B*

Received date: 4-9-2017
Revised date: 26-12-2017
Accepted date: 1-1-2018

Please cite this article as: M.L. Zamora, J.M. Dominguez, R.M. Trujillo, C.B. Goy, M.A. Sanchez, R.E. Madrid, Potentiometric textile-based pH sensor, *Sensors & Actuators: B. Chemical* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.002>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Highlights

Conductive fabrics electrodeposited with Iridium Oxide films can measure pH change.

A fully stretched Stainless steel mesh shows the best overall response to pH change.

A sweat pH measurement in human skin shows a relative error of 4% when compared with a standard method

Potentiometric textile-based pH sensor

M. L. Zamora^{a,1,*}, J.M.Dominguez^{a,1}, R.M.Trujillo^a, C.B.Goy^{a,b}, M.A.Sanchez^a,
R.E.Madrid^a

^aLaboratorio de Medios e Interfases (LAMEIN), DBI, FACET, Universidad Nacional de Tucumán Av. Independencia 1800, Tucumán, Argentina. and Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), CONICET Chacabuco 461, Tucumán, Argentina.

^bDepartamento de Electricidad, Electrónica y Computación, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, UNT. Av. Independencia 1800, 4000 – San Miguel de Tucumán, Argentina.

Abstract

Determining the pH of sweat provides valuable information for athletes and patient monitoring. This work presents a textile-based, highly sensitive pH sensor for pH determination. Three conductive fabrics (Argenmesh, Ristop silver and Stainless steel mesh (SSM)) were modified with a pH sensitive electrodeposited Iridium Oxide Film (EIROF). The three electrodeposited fabrics were characterized by impedance measurements. The Stainless Steel Mesh showed the best sensitivity to pH changes and therefore was selected for further experiments. Two configurations of this fabric were evaluated, looking for improvement in pH sensitivity and temperature dependence. The best result was obtained with the configuration that maximizes the contact surface between the stainless steel fibers, showing an error of 0.15% in the pH measurement of a buffer solution. This configuration was also used to perform in vivo measurements, obtaining an error of 4% when compared to the measurements performed with a commercial pH test

*Corresponding author

Email address: mzamora@herrera.unt.edu.ar (M. L. Zamora)

¹M L Zamora and J M Dominguez contributed equally to this work.

strip. The implementation of sensor into textiles brings some advantages such as comfort, biocompatibility and washability, among others; making the future incorporation of a sensor into a garment very possible.

Keywords: pH sensor, EIROF, Nanostructured electrode, Wearable, Athletes monitoring.

1. Introduction

Nowadays, the continuous monitoring of health status and, more specifically, physiological parameters is in growing demand among high performance athletes and the medical community. High performance athletes need an exhaustive control of their physiological variables in order to reach optimal performance, while patient monitoring would be very useful for early detection of pathologies and emergencies.

Sweat is a good option to monitor valuable information about the physiological status of the subjects [1]; being perspiration pH one important parameter to be evaluated. The information provided allows athletes to know when it is necessary to rehydrate themselves [2] [3] ; or it could be used to monitor chronic wounds, because pH provides wound condition information and can aid in determining wound response to a specific treatment [4]. In addition, changes in pH of the skin take part in the development of skin disorders such as dermatitis, ichthyosis and fungal infections [5].

In recent years, wearable technology has been the subject of much study due to the possibility of remotely and continuously monitoring a subject, allowing a rapid response to any change in physiological parameters. Wearable technology always includes one or several sensors incorporated into garments. Sweat-based

20 wearable sensors have emerged in the last few years for metabolites [6] [7], electrolytes [8] [9] and pH measurements. Regarding pH measurements, Nakata et al. [10] designed a flexible sweat chemical pH sensor sheet based on an ion-sensitive field effect transistor. Although being a good option for low-cost, disposable and wearable applications, this sensor requires sophisticated fabrication equipment
 25 and temperature compensation. In the same year, Salvo et al. [11] presented another pH sensor that used graphene oxide (GO) to detect the parameter changes; the GO is coated over the working electrode of a commercially available screen printed-board (C220BT, 33 x 10 x 0.5 mm, Dropsens). Nyein et al. [12] developed a fully integrated wearable platform that includes measurement of pH in body fluids using an ion-selective electrode (ISE) patterned on flexible PET substrate, that
 30 detects H^+ by deprotonation of polyaniline. Bandonkar et al. [13] also designed an ISE for pH detection based on polyaniline, but in this case the substrate was a disposable tattoo. Another pH sensor was developed by Caldara et al. (Caldara et al. 2012 [14] and 2016 [15]); they functionalized a cotton fabric with a colorimetric
 35 and atoxic pH indicator and designed the electronics capable of monitoring the fabric color. Other authors used flexible and adhesive microfluidic devices able to harvest skin sweat to develop wearable pH sensors. Curto et al. [3] implemented a colorimetric and disposable chemical barcode device that incorporates ionic liquid hydrogels as sensitive element, while, the approach of Koh et al. [7]
 40 consists of a paper-based colorimetric sensor. Although several approaches for wearable pH sensors have been proposed, the state of the art of textile-based ones is still poor, particularly if the desired features include low cost, simple hardware requirements and reusability.

It has been demonstrated that Iridium Oxide is sensitive to pH [16]. In addition,
 45 electrodes modified with IrO_2 have been used in electrostimulation experi-

ments, which proves its biocompatibility. A recent work by Chen et al [17] presented iridium oxide coatings for neural interface applications. In this work, the authors obtained a cell viability close to 100%, which is higher than the viability obtained with indium tin oxide coated glass, also a biocompatible material. Furthermore, Göbbels et al showed the biocompatibility of iridium oxide by growing neuronal cells over coated electrodes [18].

The work presented here describes the design, development and evaluation of potentiometric textile-based pH (PTBpH) sensors that consist of a conductive textile material with an Electrodeposited Iridium Oxide Film (EIROF). The electrodeposition was achieved following a previously reported protocol [16]. Different conductive textile materials with EIROF (*Argenmesh*, *Ristop Silver* and *Stainless steel mesh*, LessEMF, Latham NY, USA) were analyzed in order to determine which one presents greater sensitivity to pH variations and how temperature affects them. Among the evaluated materials, Stainless steel mesh textile showed the best performance for in-vivo measurements, with a 4% relative error when compared with a standard method. The designed sensors are useful to carry out perspiration pH measurements and could be easily incorporated into wearables.

2. Materials and methods

2.1. Conductive textile material

Three different conductive textiles were used in this work: *Argenmesh*, *Ristop silver* and *Stainless steel mesh* (SSM), all described by Goy et al. [19]. Briefly, *Argenmesh* fabric is composed of Nylon (Ny) threads where 55% of them are coated with Silver (Ag); *Ripstop* fabric is also made of Ny threads, but in this case, all of them are coated with Ag; and *Stainless steel mesh* fabric, which is composed

of 100% surgical stainless steel threads. It is remarkable that the wearability and comfort of conductive fabrics is very similar to traditional ones, which suggests that the sensors fabricated with these materials could be easily incorporated into garment without generating any disturb to the user.

Taking into consideration that SSM presents a low density of threads [19], this textile was folded in order to form a double layer and present a higher density.

2.2. Electrodeposition

The electrodeposition was performed in a tripolar electrochemical cell, consisting of a hemispherical stainless steel counter electrode, an Ag/AgCl reference electrode and the conductive fabric as working electrode. These textiles were cut into strips of approximately 10 cm long by 3 cm wide. They were adjusted on an acrylic cylinder by seals and an insulating material to delimit a circular area of approximately 1.5 cm² (See Figure 1). The acrylic cylinder is necessary in order to provide a mechanical support for the fabrics. This support allows immersing the fabrics into a solution, or placing them over the skin.

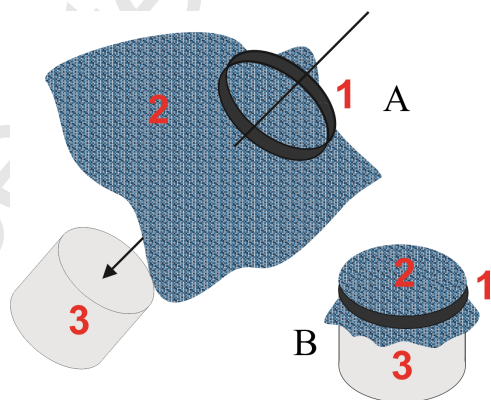


Figure 1: Configuration of the conductive fabrics (2) for electrodeposition and evaluation, where 1 is the non-conductive seal and 3 is the acrylic cylinder.

The whole procedure was performed using a potentiostat (Solartron®12508W,

Bognor Regis, UK), which consists of a Frequency Response Analyzer (Solartron®1250) and an electrochemical interface (Solartron ®SI1287).

The electrodeposition solution was prepared following the Yamanaka procedure [20] by dissolving 4 mM IrCl_4 in 40 mM oxalic acid, followed by a slow
90 addition of K_2CO_3 up to reaching a final pH of 10.3. The solution was then stirred until there was a complete dissolution of all materials. After this, the solution was kept in the dark for 8 days, until a blue color appeared. From this moment the solution was ready to be stored in the dark at 4 °C for two or three weeks prior to use.

95 Electrodeposition was made following a known potentiodynamic technique [21], which was slightly modified by Mayorga et. al. [16]. The modified technique consisted of a combination of a cyclic potential composed by a triangular wave (50 cycles between 0.0 and 0.55 V vs. Ag/AgCl reference electrode at a speed of 50 mV/s). This was applied to the fabric immersed in the previously described
100 solution, followed immediately by a rectangular potential pulsing (same potential limits for up to 3000 pulses of 0.5 s each). The initial triangular waveform is necessary to obtain adherent films. However, this initial potential cycling results in the deposition of less than 5 mC/cm^2 of EIROF [21]. The subsequent rectangular pulsing is necessary to obtain films with higher charge storage capacity (CSC).
105 The number of pulses will determine the CSC of the EIROF.

Electrodeposition was carried out in a water bath at 30°C. After the procedure was completed, the conductive textile was kept submerged for 45 minutes in the electrodeposition solution, and finally it was stored at room temperature in a dark place.

110 2.3. *Scanning electron microscopy (SEM) and Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS)*

The SEM and EDS studies were performed using a Zeiss Supra 55 VP scanning electron microscope gently provided by the Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME Universidad Nacional de Tucumán-CONICET).

2.4. *Impedance and pH measurements*

115 Impedance was measured before and after electrodeposition in the previously described tripolar cell by applying 10 mV AC (RMS), 0 V DC with a frequency sweep between 1 and 65 KHz. These measurements were performed using a Solartron®1250 Frequency Response Analyzer.

The pH calibration measurements were conducted using standard solutions of
120 pH 4, 5, 6, 7 and 8 (Cicarelli ®). These measurements were performed using an experimental set that consists of a XR38 multimeter to measure the open-circuit voltage variation of the working electrode vs. the Ag/AgCl reference electrode due to the pH changes. All the experiments were performed at 35°C, unless otherwise noted. The temperature was controlled using an LM35 temperature sensor
125 attached to the conductive textile and a water bath with controlled temperature. The impedance measurements were performed using the potentiostat previously described.

The sensor that presents the best overall response was selected by evaluating the calibration curves. Using this sensor, pH measurements were carried out in:
130 1) a saline solution of pH 7 with similar salt concentration of human sweat (Na 0.9 g/L, K 0.2 g/L, Ca 0.015 g/L and Mg 0.0013 g/L)[22] using the above described experimental set. 2) The lower back sweat of a 25-years-old male who rode a bicycle for 30 minutes. In this case, three bipolar measurements were performed using the PTBpH electrode as working electrode placed on a 5 cm thick acrylic

135 as a support, a commercial Ag/AgCl 3M electrode as reference, and the XR38 Multimeter to measure the open-circuit voltage (Figure 2). Commercial pH test strips Macherey-Nagel (Düren, Germany) -pH range between 5.4 to 7 with 9 pH steps- were used as reference method. The body temperature at the moment was 36.5 °C.

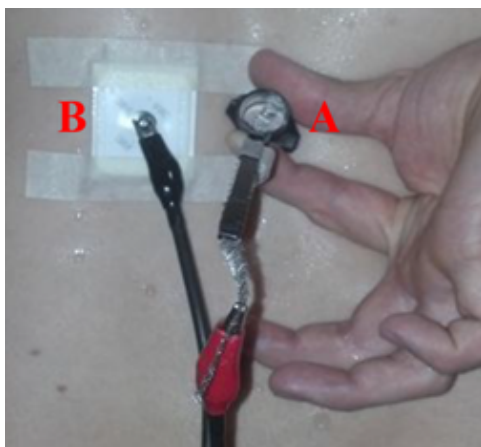


Figure 2: A) EIROF conductive fabric with the best overall response, B) Ag/AgCl 3M electrode used as reference.

140 3. Results and Discussion

3.1. SEM and EDS

In order to confirm the electrodeposition of iridium oxide over the fabrics, SEM and EDS studies were performed. Figure 3, 4 and 5 show Argenmesh, Ripstop and SSM fabrics before and after deposition of EIROF:

145 All these figures show a major change in the morphology of the fabric as a consequence of the IrO₂ electrodeposition. The presence of EIROF is confirmed with EDS, showing the Ir peaks in the modified fabrics (white arrows indicate the presence of these peaks).

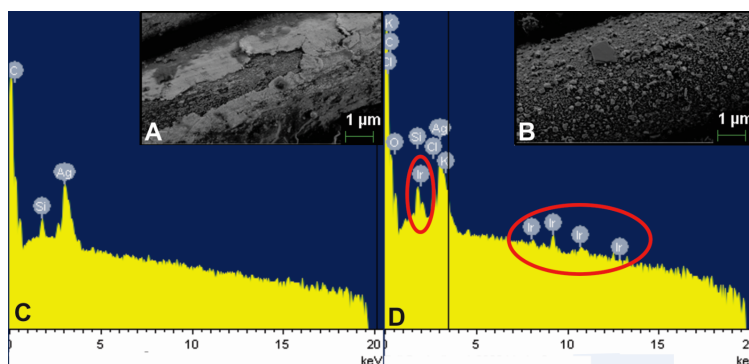


Figure 3: SEM and EDS for Argenmesh before electrodeposition (A and C) and after electrodeposition (B and D).

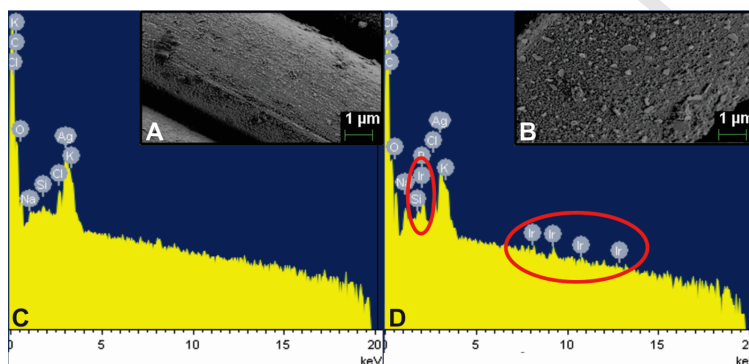


Figure 4: SEM and EDS for Ripstop before electrodeposition (A and C) and after electrodeposition (B and D).

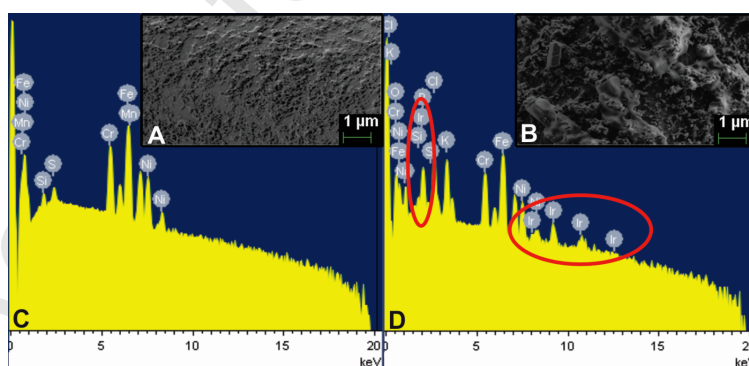


Figure 5: SEM and EDS for Ripstop before electrodeposition (A and C) and after electrodeposition (B and D).

Table I shows the differences in weight% of Ag and Ir of the fabrics before and
 150 after electrodeposition.

Fabric	Element	Weight% before deposition	Weight% after deposition
Argenmesh	Ag	36.37	30.34
	Ir	0	2.19
Ripstop	Ag	33.51	19.75
	Ir	0	0.01
SSM1	Ir	0	6.03

Table 1: Difference of the Weight% of Ag and Ir as a consequence of the electrodeposition conductive fabrics.

The analysis of SEM images and EDS results of Argenmesh and Ripstop fabrics (Figure 4B) suggest that the change in the surface morphology of these fabrics is more a consequence of the loss of silver than of the deposition of iridium oxide. Regarding Ripstop Silver, the great decrease of silver in EDS results reinforces this
 155 hypothesis (Table I).

3.2. Electrodeposition

This section presents the results of impedance measurements. Figure 6 shows the impedance for each textile before and after electrodeposition.

Figure 6A and 6B show an increase in the impedance magnitude after the electrodeposition, but for SSM the impedance decreases (figure 6C).
 160

The interpretation of impedance variation of the fabrics after IrO₂ electrodeposition is challenging since all fabrics does not have the same behavior. First, it must be noted that Argenmesh and Ripstop Silver are made of nonconductive threads with a silver coating, while Stainless Steel fabric is made of stainless steel
 165 threads without coating. According to Table 1, the amount of silver after electrodeposition is reduced from 36.37 to 30.4 weight% in Argenmesh while, in the case of Ripstop Silver, the Ag is reduced from 33.51 to 19.75 weight%. Therefore,

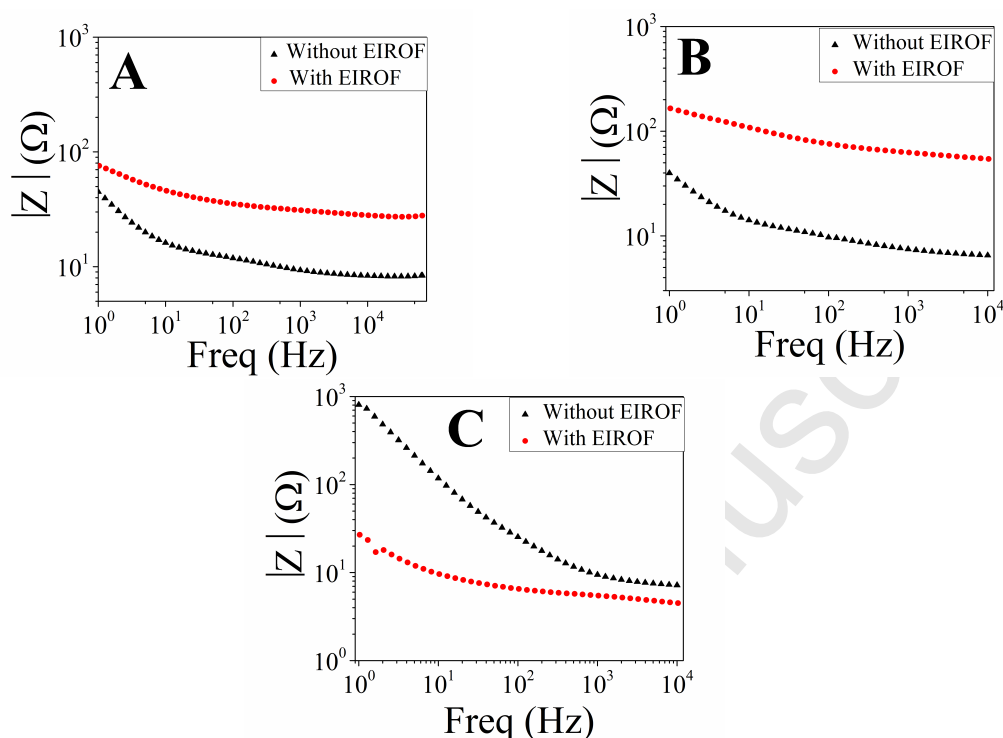


Figure 6: Variation of the impedance magnitude for A) Argenmesh, B) Ripstop Silver and C) SSM before and after electrodeposition.

some nonconductive threads could have been exposed after electrodeposition, which would lead to a reduction of the conductive surface of the fabrics. On the other hand, stainless steel threads were not modified, leading to a more effective electrodeposition (more IrO_2 was electrodeposited, Table 1), with the consequent impedance reduction (figure 6C).

Based on these observations and the results from EDS, it is hypothesized that:

a) For Argenmesh and Ripstop Silver, the lower quantity of electrodeposited IrO_2 and the loss of Ag, lead to an impedance increase after electrodeposition; and b) For Stainless steel, the higher quantity of electrodeposited IrO_2 plus no surface modification produce a reduction of impedance. This last behaviour is expected,

as was previously reported [16] and [21].

It is remarkable that –to the best of our knowledge– there are as yet no reports
 180 of IrO₂ electrodeposition on Ag. Therefore, the deep and detailed study of this
 subject would be very interesting for future investigations.

3.3. Calibration

After electrodeposition, the textiles were calibrated to determine pH. Figure 7
 shows the obtained calibration plots.

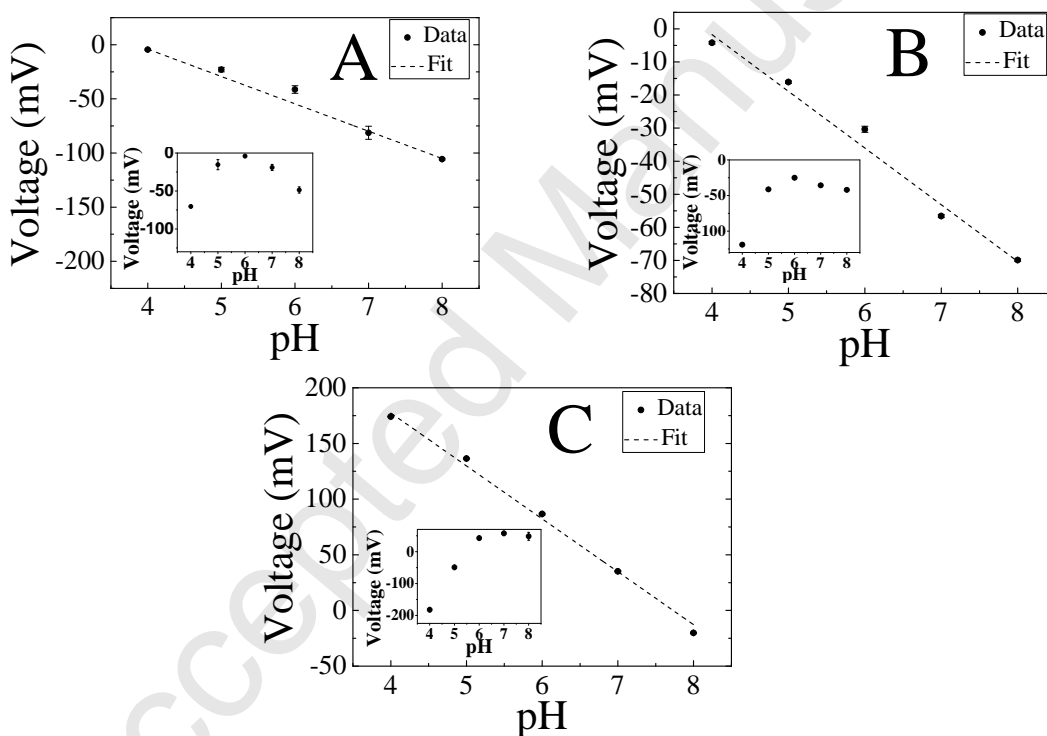


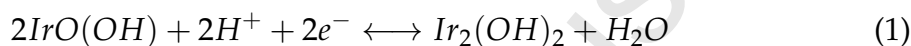
Figure 7: calibration plots for the three textiles immersed in buffer solutions with pH 4, 5, 6, 7 and 8. A) Argenmesh, B) Ripstop Silver, C) SSM. Insets show the response of the pure non-modified electrodes with pH.

SSM (Figure 7C) presents the highest sensitivity (-47.54 mV/pH) and also a
 185 very good correlation coefficient ($r^2 = 0,993$) (Table 2).

Fabric	Sensitivity (mV/pH)	r^2
Argenmesh	-25.25	0.997
Ripstop	-17.15	0.98
SSM1	-47.54	0.993

Table 2: Sensitivity and linear correlation factor

The reaction occurring at the interface of the electrodeposited electrode is the following (Mayorga Martinez et al., 2009) [23]:



The Nernst equation, which relates the involved species in the redox process,
 190 can be reduced to the following expression [23] :

$$E = E^\circ - 0.059pH \quad (2)$$

A slope of -0.059 V/pH implies a Nernstian behaviour. This sensor presents a sub-Nernstian response because the slope calculated from the calibration curve is -0.047 V.pH⁻¹ (Figure 7C).

The differences in sensitivity between the three fabrics can be explained considering the amount of electrodeposited IrO₂ showed in Table I. Table II shows
 195 that Ripstop Silver presents the lower sensitivity and, also is the one with the lower quantity of electrodeposited IrO₂. Surprisingly, a quantity as low as 0.01 Weight% of electrodeposited IrO₂ is enough to improve Ripstop pH sensitivity after deposition (Figure 7B). In the case of Stainless Steel fabric the highest quantity of electrodeposited IrO₂ leads to the highest pH sensitivity of all fabrics.
 200

Since SSM presents the best overall response, a different configuration of this fabric was also tested. This configuration consists in fully stretch the conduc-

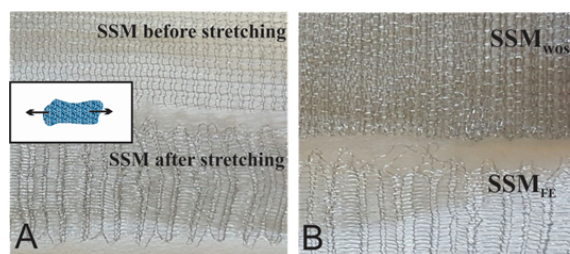


Figure 8: A) SSM before and after stretching. The arrows in the inset indicate the stretching direction. B) SSM_{WOS} and SSM_{FE} are presented for comparison.

205 tive textile in order to get a very good contact surface between the stainless steel threads (Figure 8). At this point, great care must be taken to not exert too much force that can distort the fabric. From now the SSM configuration without stretching will be named SSM_{WOS} in order to be compared with the fully stretched version (SSM_{FE}).

Figure 9 shows the calibration plot for the fully stretched SSM (SSM_{FE}) electrode in 5 different pH solutions.

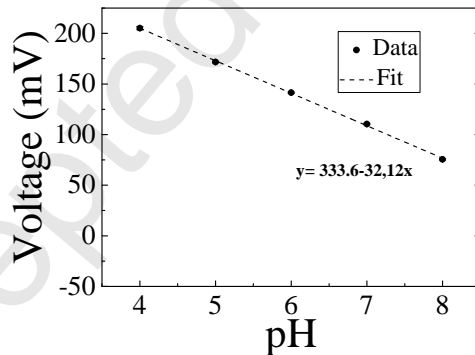


Figure 9: Calibration plot for the SSM_{FE} electrode.

210 Table 3 shows that SSM_{WOS} presents a higher sensitivity when compared with SSM_{FE} (-31,69 and -21,41 mV/pH respectively). One possible explanation of this behavior is that, since SSM_{WOS} is folded forming a double layer, it has more available surface for IrO₂ deposition than in the case of SSM_{FE}, which is expected tak-

ing into account the considerations made in Section 3.2. The highest sensitivity
 215 to pH occurs for the electrodes with the highest amount of electrodeposited IrO_2 .
 The r^2 of the two configurations are quite similar presenting only a small difference.

Fabric	Sensitivity (mV/pH)	r^2
SSM_{WOS}	-47.53	0,993
SSM_{FE}	-32.11	0,998

Table 3: Sensitivity and linear correlation factor for the SSM_{WOS} and SSM_{FE} fabrics.

3.4. Influence of temperature over pH measurements

The core temperature of the body remains in a range from 35 to 40°C, and most
 220 physiological and pathological variations of body temperature are in this range
 [24]. Given that the temperature has an influence over the pH measurements,
 the same measurements performed with SSM_{WOS} and SSM_{FE} at 35°C, were also
 carried out at 40°C. The results are presented in Figure 10.

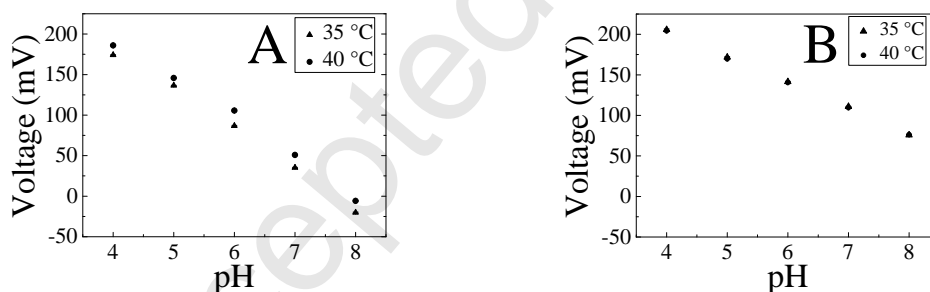


Figure 10: Response of the two SSM configurations at 35 and 40°C A) SSM_{WOS} , B) SSM_{FE}

This figure shows that the SSM_{WOS} configuration has a greater variation with
 225 temperature than the SSM_{FE} . Because of this, despite the fact that SSM_{WOS} has
 a higher sensitivity, SSM_{FE} was selected to perform the following pH measure-
 ment. This decision was taken in order to avoid temperature compensation in pH
 measurements.

3.5. pH measurements

230 Considering that the typical pH of a human sweat during exercise covers a range from 5 to 7 [3], the pH of a saline solution with a similar salt concentration of human sweat [22] (pH=7) was measured using the SSM_{FE} configuration. The sensor gave a response of 108.35 mV when submerged in the solution. The pH was calculated by using equation from Figure 9, obtaining a value of 7.011. The
235 error in the measurement was calculated as:

$$Error : \frac{pH(sample) - pH(electrode)}{pH(sample)} \times 100 \quad (3)$$

An error of 0.15% was obtained, demonstrating the good response of the sensor.

Then, three pH measurements in real skin were performed using the SSM_{FE} electrode. The pH recording was carried out as previously described (section 2.4).
240 An average voltage of 120.2 mV was obtained with a standard deviation of 1.32 mV. This voltage corresponds to a pH of 6.2, which was calculated by using the equation showed in Figure 9. In order to compare these results with a standard technique, the pH of sweat was measured with a commercial pH test strip. The pH measurement with this reference method, gave a pH value of 6.5, which implies
245 a relative error (RE) of 4%. The pH readout obtained with the PTBpH sensor was achieved in a few seconds. The same RE was obtained by Curto et al. [3], but after a measurement time of 30 minutes. This fact is considered a very good advantage of the PTBpH sensors presented here.

It is important to remark that pH measurements are usually affected by ionic
250 strength. It is well known that most pH test systems are designed for lab use where solutions are highly buffered. However, low ionic strength solutions are

poor conductors, and pH measurements could be inaccurate and noisy. In the present case the sensor was calibrated in a buffer solution. The human sweat has similar salt concentration to the buffer, making the ionic strength not an issue for sweat pH measurement in the present case.

As was mentioned, it is remarkable that the wearability and comfort of conductive fabrics is very similar to traditional ones, which suggests that they could be easily incorporated into garment. A possible configuration could be to incorporate the PTBpH sensor into a girdle, which gives the necessary mechanical support being comfortable and wearable. Figure 11 shows a prototype, which includes the PTBpH sensor, the reference electrode and the girdle. The Multimeter is only used for evaluation purpose, but the final design would include a small measurement interface and a wireless communication module, which is simple to implement.

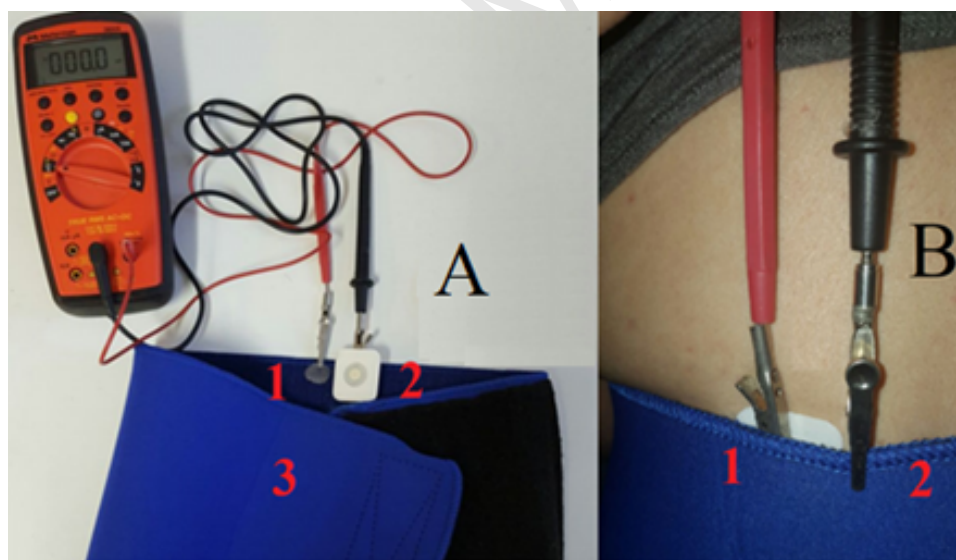


Figure 11: embodiment of the PTBpH electrode into a garment where A (left) shows the possible integration of the sensor into a garment: 1) PTBpH sensor, 2) commercial Ag/AgCl 3M electrode, and 3) girdle. B) Arrangement of the measurement set over the human skin, where 1) is the commercial Ag/AgCl 3M electrode and 2) is the PTBpH sensor.

It is noteworthy that, besides the sensor designed by Caldara et al. [14] [15],
 265 there has not been reported in the bibliography another textile-based pH sensor.
 An advantage of the PTBpH sensors here presented is that they are based on open
 circuit voltage measurements, which could give a direct pH measurement, dif-
 ferent from the colorimetric method needed by the Caldara sensor. Besides, us-
 ing these sensors, the problem of sweat harvesting is solved without the need of
 270 pumps or sophisticated system designs, since they work in direct contact with the
 skin.

4. Conclusion

A pH sweat sensor was presented, which showed a good sensitivity and cor-
 relation in pH measurements. Between the three IrO₂ modified fabrics, the SSM
 275 presents the best response. This fabric was used in two different configurations,
 SSM_{WOS} and SSM_{FE}, showing differences in sensitivity and temperature depen-
 dence for pH response. The best result was obtained with the configuration that
 maximizes the contact surface between the stainless steel fibers (SSM_{FE}), which
 can measure sweat phantoms of different pH with an error of 0.15%. This config-
 280 uration was also less affected by temperature. Measurements of the pH of sweat in
 real skin exhibited good response, with an error of 4% compared with a reference
 measurement made with a commercial pH test strip.

As was mentioned in the introduction of the manuscript, several approaches
 for wearable pH sensors have been proposed. Nevertheless, the state of the art
 285 of textile-based ones is still poor, moreover, if low cost, simple hardware require-
 ments and reusability are desired features for them. The PTBpH sensor proposed
 here presents some advantages over the sensors of the previous mentioned lit-
 erature. The major ones are its low cost, simple hardware requirements and the

possibility to find a great number of SSM fabrics with different threads size in the
 290 market. In addition, the biocompatibility characteristics of IrO₂ coatings allow
 the PTBpH sensor to be used without major risks. Another great advantage when
 compared against the other available wearable pH sensor is washability. Since
 IrO₂ coating is firmly attached to the SSM fabric, it can be easily washed with DI
 water.

295 Because of these features, the PTBpH is highly reusable and wearable, as was
 previously showed with the sensor integrated in a sport belt. Finally, another
 important fact to remark is the absence of potentiometric textile based sensors in
 the bibliography, which increases the novelty and originality of this work.

References

- 300 [1] M. Beauchamp, L. C. Lands, Sweat-testing: A review of current technical
 requirements, *Pediatric Pulmonology* 39 (6) (2005) 507–511. doi:10.1002/
 ppul.20226.
- [2] J. Douglas, E. Lawrence, K. Susan, J. Scott, National Athletic
 Trainers{\textquoteright} Association Position Statement:Fluid Replace-
 305 ment for Athletes 35 (2) (2000) 1–13.
- [3] V. F. Curto, C. Fay, S. Coyle, R. Byrne, C. O'Toole, C. Barry, S. Hughes,
 N. Moyna, D. Diamond, F. Benito-Lopez, Real-time sweat pH monitoring
 based on a wearable chemical barcode micro-fluidic platform incorporating
 ionic liquids, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 171-172 (2012) 1327–1334.
 310 doi:10.1016/j.snb.2012.06.048.
 URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.06.048>

- [4] G. Gethin, The significance of surface pH in chronic wounds, *Wounds UK* 3 (3) (2007) 52–56.
- [5] M. H. Schmid-Wendtner, H. C. Korting, The pH of the skin surface and its
 315 impact on the barrier function, *Skin Pharmacology and Physiology* 19 (6)
 (2006) 296–302. doi:10.1159/000094670.
- [6] W. Gao, S. Emaminejad, H. Y. Y. Nyein, S. Challa, K. Chen, A. Peck, H. M.
 Fahad, H. Ota, H. Shiraki, D. Kiriya, D.-H. Lien, G. A. Brooks, R. W. Davis,
 A. Javey, Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ per-
 320 spiration analysis, *Nature* 529 (7587) (2016) 509–514. arXiv:arXiv:1011.1669v3, doi:10.1038/nature16521.
 URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature16521>
- [7] A. Koh, D. Kang, Y. Xue, S. Lee, R. M. Pielak, J. Kim, T. Hwang, S. Min,
 A. Banks, P. Bastien, M. C. Manco, L. Wang, K. R. Ammann, K.-I. Jang,
 325 P. Won, S. Han, R. Ghaffari, U. Paik, M. J. Slepian, G. Balooch, Y. Huang, J. A.
 Rogers, A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage, and
 colorimetric sensing of sweat, *Science Translational Medicine* 8 (366) (2016)
 366ra165–366ra165. doi:10.1126/scitranslmed.aaf2593.
 URL [http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.](http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.aaf2593)
 330 [aaf2593](http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.aaf2593)
- [8] S. Emaminejad, W. Gao, E. Wu, Z. A. Davies, H. Yin, Y. Nyein, S. Challa,
 Autonomous sweat extraction and analysis applied to cystic fibrosis and
 glucose monitoring using a fully integrated wearable platform (2017) 1–
 6doi:10.1073/pnas.1701740114.

- 335 [9] T. Glennon, C. O'Quigley, M. McCaul, G. Matzeu, S. Beirne, G. G. Wallace, F. Stroeescu, N. O'Mahoney, P. White, D. Diamond, 'SWEATCH': A Wearable Platform for Harvesting and Analysing Sweat Sodium Content, *Electroanalysis* 28 (6) (2016) 1283–1289. doi:10.1002/elan.201600106.
- [10] S. Nakata, T. Arie, S. Akita, K. Takei, Wearable, Flexible, and Multifunctional
340 Healthcare Device with an ISFET Chemical Sensor for Simultaneous Sweat pH and Skin Temperature Monitoring, *ACS Sensors* 2 (3) (2017) 443–448. doi:10.1021/acssensors.7b00047.
- [11] P. Salvo, N. Calisi, B. Melai, B. Cortigiani, M. Mannini, A. Caneschi, G. Lorenzetti, C. Paoletti, T. Lomonaco, A. Paolicchi, I. Scataglini, V. Dini, M. Romanelli, R. Fuoco, F. Di Francesco, Temperature and pH sensors based on
345 graphenic materials, *Biosensors and Bioelectronics* 91 (January) (2017) 870–877. doi:10.1016/j.bios.2017.01.062.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.062>
- [12] H. Y. Y. Nyein, W. Gao, Z. Shahpar, S. Emaminejad, S. Challa, K. Chen, H. M. Fahad, L. C. Tai, H. Ota, R. W. Davis, A. Javey, A Wearable Electrochemical
350 Platform for Noninvasive Simultaneous Monitoring of Ca²⁺ and pH, *ACS Nano* 10 (7) (2016) 7216–7224. doi:10.1021/acsnano.6b04005.
- [13] A. J. Bandodkar, V. W. S. Hung, W. Jia, G. Valdés-Ramírez, J. R. Windmiller, A. G. Martinez, J. Ramírez, G. Chan, K. Kerman, J. Wang, Tattoo-based potentiometric ion-selective sensors for epidermal pH monitoring, *The Analyst*
355 138 (1) (2013) 123–128. doi:10.1039/C2AN36422K.
URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C2AN36422K>

- [14] M. Caldara, C. Colleoni, M. Galizzi, E. Guido, V. Re, G. Rosace, A. Vitali,
 Low power textile-based wearable sensor platform for pH and tempera-
 360 ture monitoring with wireless battery recharge, 2012 IEEE Sensors (2012)
 1–4doi:10.1109/ICSENS.2012.6411146.
 URL [http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?](http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6411146)
 arnumber=6411146
- [15] M. Caldara, C. Colleoni, E. Guido, V. Re, G. Rosace, Optical monitoring of
 365 sweat pH by a textile fabric wearable sensor based on covalently bonded
 litmus-3-glycidoxypopyltrimethoxysilane coating, Sensors and Actuators,
 B: Chemical 222 (2016) 213–220. doi:10.1016/j.snb.2015.08.073.
 URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.08.073>
- [16] C. C. Mayorga Martinez, R. E. Madrid, C. J. Felice, Electrochemical and geo-
 370 metrical characterization of iridium oxide electrodes in stainless steel sub-
 strate, Sensors and Actuators, B: Chemical 133 (2) (2008) 682–686. doi:
 10.1016/j.snb.2008.03.037.
- [17] Y. M. Chen, T. W. Chung, P. W. Wu, P. C. Chen, A cost-effective fabrication of
 iridium oxide films as biocompatible electrostimulation electrodes for neural
 375 interface applications, Journal of Alloys and Compounds 692 (2017) 339–345.
 doi:10.1016/j.jallcom.2016.09.064.
 URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.09.064>
- [18] K. Göbbels, T. Kuenzel, A. van Ooyen, W. Baumgartner, U. Schnakenberg,
 P. Bräunig, Neuronal cell growth on iridium oxide, Biomaterials 31 (6) (2010)
 380 1055–1067. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.10.029.

- [19] C. B. Goy, J. M. Dominguez, M. A. Gómez López, R. E. Madrid, M. C. Herrera, Electrical characterization of conductive textile materials and its evaluation as electrodes for venous occlusion plethysmography, *Journal of Medical Engineering & Technology* 37 (6) (2013) 359–367. doi:10.3109/03091902.2013.812689.
 385 URL <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03091902.2013.812689>
- [20] K. Yamanaka, Anodically electrodeposited iridium oxide films (AEIROF) from alkaline solutions for electrochromic display devices, *Japanese Journal of Applied Physics* 28 (4 R) (1989) 632–637. doi:10.1143/JJAP.28.632.
 390
- [21] R. D. Meyer, S. F. Cogan, T. H. Nguyen, R. D. Rauh, Electrodeposited iridium oxide for neural stimulation and recording electrodes, *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 9 (1) (2001) 2–11. doi:10.1109/7333.918271.
- [22] S. J. Montain, S. N. Cheuvront, H. C. Lukaski, Sweat mineral-element responses during 7 h of exercise-heat stress, *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 17 (6) (2007) 574–582.
 395
- [23] C. C. M. Martinez, R. E. Madrid, C. J. Felice, A pH sensor based on a stainless steel electrode electrodeposited with iridium oxide, *IEEE Transactions on Education* 52 (1) (2009) 133–136. doi:10.1109/TE.2008.921451.
 400
- [24] T. Tagawa, T. Tamura, P. A. Oberg, *Biomedical Sensors and Instruments*, 2011.

Martin L. Zamora is a post doctoral fellow at the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) in Argentina. He earned his BS in Biotechnology and PhD in Biological Sciences at the Universidad Nacional de Tucumán, Argentina where he studied with Prof. Madrid. His interest is in biosensors, electrochemical sensors and microsystems.

Juan Martín Domínguez earned his BS in Bioengineering at the Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. His main interest are sensors, medical devices and medical technology.

Ricardo Matías Trujillo is a PhD student in Biosensors at the Laboratory of Medium and Interfaces within the National Scientific and Technical Research Council of Argentina (CONICET). He earned his Biomedical Engineering degree from the National University of Tucumán, Argentina. His main research fields include sensors and biosensors systems for human health and agriculture applications such as early plant disease detection.

Carla B. Goy is a post doctoral fellow at the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) in Argentina. She also is a Professor in the Departamento de Electricidad, Electrónica y Computación at the Facultad de Ciencias Exactas y Tecnologías. She earned her Bioengineering degree and earned her PhD in Engineering from the Universidad Nacional de Tucumán. Her main research fields include sensors and microfluidic systems for biomedical applications.

Maria A. Sanchez is a PhD student in Biosensors and Tissue Engineering at the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) in Argentina. She earned her Biomedical Engineering degree from the National University of Tucumán, Argentina. Her main research fields include sensors and biosensors, nanotechnology and tissue engineering.

Rossana E. Madrid is Professor of the Bioengineering Department at the University of Tucumán, Argentina and Independent Researcher at the National Scientific and Technical Research Council of Argentina (CONICET). She earned her Electronic Engineer degree and earned her PhD in Bioengineering from the University of Tucumán. She is Professor of Biomedical Transducers and Biosensors and Microsystems of the Biomedical Engineering Program, and also directs the Doctoral degree program. Her main research fields include sensors and biosensors, and microfluidic systems for biomedical and environmental applications.